

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年10 月3 日 (03.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/077642 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/50, 33/15, 33/566, A61P 13/12, A61K 45/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/02828
- (22) 国際出願日: 2002 年3 月25 日 (25.03.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-88018 2001 年3 月26 日 (26.03.2001) JP  
特願2001-270551 2001 年9 月6 日 (06.09.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本新薬株式会社 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) [JP/JP]; 〒601-8550 京都府 京都市 南区吉祥院西ノ庄門口町 1 4 番地 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 青山 葆, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目3 番7 号 IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高垣 和史 (TAKAGAKI, Kazuchika) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県 つく
- ば市 二の宮 4 丁目2 番1 7 号 Ibaraki (JP). 勝間 進 (KATSUMA, Susumu) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県 つくば市 二の宮 4 丁目8 番3 号二の宮団地7 棟4 0 3 号 Ibaraki (JP). 辻本 豪三 (TSUJIMOTO, Gozoh) [JP/JP]; 〒158-0091 東京都 世田谷区 中町 1 丁目1 4 番1 8 号 Tokyo (JP).
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MTHOD OF SCREENING DRUG FOR PREVENTING/TREATING PROLIFERATIVE GLOMERULAR NEPHRITIS

(54) 発明の名称: 増殖性糸球体腎炎の予防・治療用薬物のスクリーニング方法

(57) Abstract: A method of screening a compound efficacious in preventing/treating proliferative glomerular nephritis, in particular, mesangial proliferative glomerular nephritis characterized by depending on the effect of inhibiting the activation of Edg-5.

(57) 要約:

増殖性糸球体腎炎特にメサングウム増殖性糸球体腎炎の予防・治療に有効な成分をスクリーニングする方法であって、Edg-5の活性化を抑制する作用に基づくことを特徴とする方法を提供する。

WO 02/077642 A1

## 明 細 書

## 増殖性糸球体腎炎の予防・治療用薬物のスクリーニング方法

## 5 技術分野

本発明は、増殖性糸球体腎炎、特にメサンギウム増殖性糸球体腎炎の予防・治療用医薬組成物の有効成分をスクリーニングする方法に関する。

## 背景技術

- 10 増殖性糸球体腎炎は糸球体内に細胞増殖を伴う糸球体腎炎であって、急性から慢性まで、様々な腎炎が含まれる。慢性腎炎に属するものにメサンギウム増殖性糸球体腎炎と膜性増殖性糸球体腎炎があり、メサンギウム増殖性糸球体腎炎はイムノグロブリンA腎症ともいわれ、世界的に最も一般的な腎疾患の一つである。その病理学的な特徴としては、血尿、循環するIgAレベルの上昇、IgAや補
- 15 体C<sub>3</sub>、フィブネクチン、コラーゲン等の糸球体への異常な沈着、メサンギウム細胞の増殖等が挙げられる。この疾患の患者のほとんどが透析を必要とする末期の腎不全へと進行することから、早期に適切な治療を施す必要がある。以下、主として本発明をメサンギウム増殖性糸球体腎炎との関係で説明するが、広く増殖性糸球体腎炎に適用されることは明らかである。また、「メサンギウム増殖性
- 20 糸球体腎炎」を、「イムノグロブリンA腎症（IgA腎症又はIGAN）と同意義に用いる。

- I G A Nにおけるメサンギウム細胞の増殖反応には、多くの成長因子やサイトカインが関与しているとの報告があり（Floegeら, Kidney Int. 43 : S47-S54, 1993）、中でもメサンギウム細胞に対し強い増殖作用を示す血小板由来増殖因子
- 25 （PDGF : Platelet-Derived Growth Factor）が、重要な役割を担っているとの報告（Floege ら, Clin. Exp. Immunol. 86 : 334-341, 1991）がある。また、メサンギウム増殖性糸球体腎炎患者において、メサンギウム細胞の増殖にPDGF受容体が強く関与するとの報告もある（Gesualdo ら, J. Clin. Invest 94 : 50-58, 1994）。このような状況下、PDGF刺激下でのメサンギウム細胞の増

殖を抑制する物質（PDGF受容体拮抗物質）が、IGANの治療又は予防剤として有効と提供された（特開平10-120568号公報）。一方、メサンギウム細胞の増殖とB細胞刺激因子としてクローニングされたインターロイキン6（IL-6）との関係も知られており、実際、糸球体腎炎ではIL-6トランスジェニックマウスで高度の蛋白尿を伴うメサンギウム増殖性糸球体腎炎が認められ、抗IL-6抗体を投与すると症状の改善が認められたという報告がある（日本臨床、第50巻、2840-2841頁（1992年）。このような観点から、IGANの治療、予防剤として、IL-6活性阻害物質が提供されている（特開平10-338680、特開平10-338678等）。

しかしながら、IL-6活性阻害物質の場合、IL-6受容体は多くの細胞（Tリンパ球やBリンパ球、単球、繊維芽細胞、皮膚ケラチノサイト、血管内皮細胞、腎メサンギウム細胞、脳アストロサイト、骨芽細胞）で産生されており、その生理活性は免疫系、造血系、脳神経系、炎症系、内分泌系など多岐にわたることから（ザ・サイトカイン・ハンドブック第2版（The Cytokine Handbook）、アカデミック・プレス社、USA、145-168頁（1994年））、目的とする組織以外の組織に対しても何らかの影響が及ぶ恐れがあり、適用が困難と考えられる。

また、PDGFアンタゴニストの場合も、それが多くの組織で発現されていることから、IL-6受容体と同様に目的以外の作用を及ぼす可能性がある。

従って、増殖性糸球体腎炎、特にメサンギウム細胞の増殖を伴うIGAN等の腎炎に特異的に効果のある医薬の開発が強く求められている。そのためには、多くの化合物（物質）の中から、目的に適う候補化合物を効率よく選択する手段を確立する必要がある。

#### 発明の開示

本発明者らは、増殖性糸球体腎炎、特にメサンギウム細胞の増殖を伴うIGAN等に対して特異的で安全性の高い予防又は治療用医薬の開発を目指して鋭意研究を重ねてきたが、その過程で、Edg（endothelial differentiation gene）ファミリー受容体がメサンギウム細胞の活性化に重要な役割を担っていることを見出した。

Edgファミリーは、G蛋白質共役型受容体スーパーファミリーに属する膜結合型受容体蛋白質をコードする遺伝子として既知である。この受容体ファミリーは、7つの膜貫通領域を有しており、薬物のターゲット分子として好適であると考えられる。

- 5      Edgファミリーには高い配列ホモロジーを持つ8つのサブタイプ (Edg-1~Edg-8) が存在するが、本発明者らは、予想外にも、メサンギウム細胞の増殖が観察されない段階でEdg-5が顕著に上方制御されているとの知見を得た。Edg-5は細胞増殖や細胞の遊走・アポトーシスに関与すると示唆されている (J Biol Chem 2000 Jan 7;275(1):288-96, Sphingosine 1-phosphate-
- 10      induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. An S, Zheng Y, Bleu T) が、Edg-5とメサンギウム細胞の増殖との関係は、本発明以前には知られていなかった。

- 15      ヒト、マウス及びラットのEdg-5のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列は既知であり、Genbankに登録されている (W099/54351, W000/60056, Genbankのアクセッション番号: Human AF034780; mouse AF108020; Rat U10699)。しかし、これらの公報には、Edg-5の生体内での機能に関し、上記Gタンパク結合受容体として一般的に知られている活性が列挙されているにすぎない。

- 20      ヒト、マウス、及びラットのEdg-5をコードするヌクレオチド配列をそれぞれ配列番号1、3及び5に示す。また、これらのヌクレオチド配列のCDS領域によりコードされているアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号2、4、及び6に示す。

- 25      本発明者らは、IGANに関連する様々な因子の分子メカニズムを検討するために、cDNAマイクロアレイを用い、IGANのモデルマウス (以下、「HIGAマウス」と称する) の腎臓における遺伝子発現の変化について解析を行った。該マウスの受精卵は通商産業省生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センターに寄託されている (FERM P-18150)。このゲノミックなアプローチによって、一つ一つの遺伝子というよりはむしろIGANに関与する遺伝子のフ

ファミリーを同定し、複雑な疾患の進行においてどのような分子レベルの現象が重要であるかを明らかにすることができた。即ち、H I G Aマウスの腎臓では、PDGF、PDGF受容体、SPP (sphingosine 1-phosphate) 受容体であるEdg-5 (endothelial differentiation gene-5) など、細胞周期や細胞増殖の制御に関与している幾つかの遺伝子の発現が上昇していた。また、培養ラットメサンギウム細胞を用いる実験で、PDGFはEdg-5のアップレギュレーション (又は上方制御) を伴うメサンギウム細胞の増殖を誘導した。これらの結果は、SPP合成の増加と連結するPDGF-Edg-5シグナルの増強が、IGANにおける腎臓のメサンギウム細胞の増殖において重要な役割を果たしていることを示唆している。しかも、Edg-5の上方制御は、IGANを発症する前、メサンギウム細胞の増殖が顕著でない時点で認められることから、該受容体の上方制御がメサンギウム細胞の増殖、延いてはIGANの発症、進行に重要な役割を担っていることを強く示唆している。

PDGF-刺激によって起るメサンギウム細胞の増殖シグナル伝達機序を模式的に図1に示した。即ち、PDGFで刺激された細胞はPDGFを生産・放出し、オートクライン及びパラクラインの機構によって細胞表面のPDGF受容体の発現が増加する。PDGFはメサンギウム細胞のスフィンゴミエリナーゼとセラミダーゼを活性化し、SPPの合成が増加し、SPPはまた、活性化した、若しくは凝集性の血小板からも放出される。SPPは、オートクラインでまたは分子内のセカンドメッセンジャーとして働くことにより、メサンギウム細胞の増殖を引き起こすと考えられる。リガンドであるSPPとその受容体Edg-1、Edg-3、Edg-5 (特にEdg-5) の合成量の増加は相乗的なものと考えられる。H I G Aマウス腎臓でPDGF/PDGF受容体とEdg-5の発現が増大したという結果は、細胞増殖活性につながる成長因子シグナルとリンクするカスケードの増幅のために、PDGF-SPP-1-Edgパスウェイが正のフィードバックループ中で作用している可能性を示唆している。さらに、メサンギウム細胞からのSPPはEdg-5の発現上昇を通して血小板を活性化し、血小板からのSPPの分泌も促進するというように、IGANの進行中正のフィードバックループ内で次々に作用が起こる。これらの悪循環のすべてがH I G Aマウス腎臓におい

て作動していると考えられる。H I G Aマウスにおける糸球体腎炎の所見は、ヒトの糸球体腎炎に酷似していることから、ヒトの糸球体腎炎においても同様のメカニズムが想定され、こういった観点から、上記の一連のメカニズムと I G A N が難治性疾患であることとの関連性が指摘できる。

- 5       本発明者らは、E d g - 5 がメサンギウム細胞の増殖を引き起こし、また E d g - 5 の上方制御がその増殖を増強することから、E d g - 5 の活性化を抑制する物質が、I G A N の特異的な予防・治療薬となりうるとの見解に達した。

即ち、本発明は、

- 10       (1) 増殖性糸球体腎炎の予防・治療薬をスクリーニングする方法であって、E d g - 5 の活性化を抑制する作用に基くことを特徴とする方法、

      (2) E d g - 5 のリガンドと、E d g - 5 又はそれと同等のポリペプチドとの結合を阻害する作用に基くことを特徴とする、上記 (1) に記載の方法、

      (3) E d g - 5 又はそれと同等のポリペプチドが以下の群から選択される上記 (2) に記載の方法：

- 15       ① 配列表の配列番号 2、4 若しくは 6 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g - 5 のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、

- ② 配列表の配列番号 2、4 若しくは 6 に記載のアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g - 5 のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、

- 20       ③ 配列表の配列番号 2、4 若しくは 6 に記載のアミノ酸配列において、1 個以上のアミノ酸の欠失、置換、付加若しくは挿入を有するアミノ酸で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g - 5 のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、及び

- 25       ④ 前記①～③のいずれかに記載のポリペプチドを含有するポリペプチド、

      (4) 上記 (2) 又は (3) に記載のポリペプチドを含有する細胞、該細胞由来の細胞膜面分若しくは単離された蛋白質を用いる、上記 (2) 又は (3) に記載の方法、

      (5) 前記細胞が、上記 (2) 又は (3) に記載のポリペプチドをコードする

ポリヌクレオチドを導入され、該ポリヌクレオチドを発現している細胞である、  
上記（４）に記載の方法、

（６）前記ポリヌクレオチドが以下の群から選択される、上記（５）に記載の  
方法：

5      ① 配列表の配列番号 1、3 若しくは 5 に記載の塩基配列で示されるポリヌ  
レオチド；

② 配列表の配列番号 1、3 若しくは 5 に記載の塩基配列を有するポリヌクレ  
オチドに対してその全長にわたり少なくとも 80% の同一性を有するポリヌクレ  
オチド；

10      ③ 配列表の配列番号 1、3 若しくは 5 に記載の塩基配列と縮重を介して異なる  
塩基配列で示されるポリヌクレオチド；及び

④ 上記①～③に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイ  
ブリダイズしうるポリヌクレオチド、

（７）Edg-5 又はそれと同等のポリペプチドとリガンドとを接触させた場  
15      合と、Edg-5 又はそれと同等のポリペプチド、リガンドおよび試験物質とを  
接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、上記（２）～（６）のい  
ずれかに記載の方法、

（８）比較を、Edg-5 又はそれと同等のポリペプチドを含有する細胞に対  
するリガンドの刺激活性（シグナル伝達作用）の変化、Edg-5 又はそれと同  
20      等のポリペプチドに対するリガンドの結合量の変化、または細胞内での Edg-  
5 の発現・産生量の変化に基づいて行なうことを特徴とする、上記（２）～  
（７）のいずれかに記載の方法、

（９）Edg-5 を発現しうる細胞における Edg-5 の産生量又は mRNA  
の量を定量することを特徴とする、上記（１）に記載の方法、

25      （１０）配列番号 2、4 若しくは 6 に記載のポリペプチドをコードするポリヌ  
クレオチド又はその一部を用いて Edg-5 の mRNA を定量することを特徴と  
する、上記（９）に記載の方法、

（１１）上記（１）～（１０）のいずれかに記載の方法を実施するためのキッ  
ト、

(12) 上記(1)～(10)のいずれかに記載の方法又は上記(11)に記載のキットを用いて得られる増殖性糸球体腎炎の予防・治療薬、

(13) 上記(1)～(10)のいずれかに記載の方法又は上記(11)に記載のキットを用いて、Edg-5のリガンドと、Edg-5又はそれと同等のポリペプチドとの結合を阻害するか、Edg-5の発現・産生を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする工程、前記物質の増殖性糸球体腎炎に対する予防又は治療効果を確認する工程、及び前記工程で増殖性糸球体腎炎に対する予防又は治療効果が確認された物質を有効成分として含有する増殖性糸球体腎炎の予防・治療薬の製造方法、

などに関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、PDGF-刺激によって起るメサングウム細胞の増殖シグナル伝達機序を示す模式図である。

図2は、それぞれ、(A) 6週齢及び(B) 25週齢の、雌のHIGAマウスより腎臓を摘出し、パラフィンで方埋を行い、パラフィン切片をパス染色したものを光学顕微鏡で観察した結果を示す写真の模写図である。

図3は、標準化腎臓cDNAライブラリーを用いて調製したcDNAマイクロアレイを用い、HIGAマウス(縦軸)と、該HIGAマウスと年齢及び性別が等しいddyマウス(横軸)の腎臓から調製したmRNAを用いて遺伝子発現を解析した結果を示す図であり、上は6週齢、下は25週齢の動物における解析結果である。

図4は、それぞれ、6週齢(6W)及び25週齢(25W)のHIGAマウスと、該HIGAマウスと年齢及び性別が等しいddyマウスの腎臓から調製したmRNAを用いてEdgファミリーの8つのサブタイプの発現レベルについて解析した結果を示す写真の模写図(A)、及び結果をHIGA/ddyの比で表したグラフ(B)である。

図5は、PDGF-BB、bFGF又はEGFによってラットメサングウム培養細胞に増殖刺激を与え、各処理の2、4、8、26時間後にXTT assay kit (ロッシ



エ・ダイアグノティクス社)を用いてメサングウム細胞の増殖を測定した結果を示す図である。図中、四角はbFGF、三角はPDGF-BB、丸はEGFを培地に添加したときの結果を示す。

5 発明を実施するための最良の形態

本発明のスクリーニング方法は、Edg-5の活性化がメサングウム細胞増殖を刺激し、もってIGANの発症、進行をもたらすとの知見に基いており、生体内でのEdg-5の活性化を抑制する物質、とりわけEdg-5ーリガンド結合を阻害する任意の物質を標的としている。

10 本明細書中、「Edg-5の活性化」とは、Edg-5にリガンドが結合することによりその生理活性（生物活性）が発揮されること、又は、Edg-5の上方制御によりその生理活性が増強されること、その他Edg-5の生理活性が発揮されることをいう。なお、Edg-5の生理活性としては、メサングウム細胞表面に発現しているEdg-5がリガンドと結合することにより、細胞内にシグナルを伝達し、図1に記載の一連の増殖シグナルの伝達を刺激し、メサングウム細胞を増殖させるという活性が例示される。

15 また、本明細書中、Edg-5の「上方制御（アップレギュレーション）」とは、当該技術分野で用いられる通常の意味を有し、Edg-5遺伝子の発現が増加することを意味する。Edg-5遺伝子の上方制御は、例えば、図1に模式的に示した一連のメサングウム細胞の増殖シグナル伝達機序のいずれかの段階で作用し、正のフィードバック機構を介するEdg-5遺伝子の発現増大などの形で起ると考えられる。

20 従って、Edg-5の活性化を抑制する物質は、Edg-5の上方制御を抑制する物質を包含し、そのような物質としては、リガンドーEdg-5結合反応の阻害物質のみならず、図1のシグナル伝達機構の任意の部位をブロックする物質が例示されるが、それらに限定されない。

25 「Edg-5又はそれと同等のポリペプチド」とは、リガンドと結合して、図1に記載の細胞活性化シグナルを伝達し得るEdg-5蛋白質、Edg-蛋白質と同質の活性を有するポリペプチド、リガンドとの結合に必須の部分の有するそ

これらの断片、であり、以下のポリペプチド類が例示される。

「実質的に同質の活性」とは、E d g - 5 に特徴的なリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用と、同質の活性を指す。従って、実質的に同質の活性を有するポリペプチドは、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性において

5 E d g - 5 と同等（例、約0.01～100倍、好ましくは0.03～30倍、より好ましくは0.1～10倍）の活性を有する。リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができる。

E d g - 5 又はそれと同等のポリペプチドの例として、配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列を含有する蛋白質及び、これら配列番号2、4若しくは6のいずれかと約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する配列を含有し、かつ、配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有するポリペプチド；配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列に対して、1個以上（好ましくは、1～30

10 個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～数個のアミノ酸の欠失、置換又は挿入がなされたアミノ酸配列を含有し、かつ、配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有するポリペプチドが挙げられる。

本発明の好ましい実施態様では、E d g - 5 又はそれと同等のポリペプチドとして、

20

① 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g - 5 のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、

② 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g - 5 のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、

25

③ 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸の欠失、置換、付加若しくは挿入を有するアミノ酸で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g - 5 のリガンドとの結合活性を有するポ

リペプチド、及び

④ 前記①～③のいずれかに記載のポリペプチドを含有するポリペプチドが挙げられる。

本明細書中、上記の「E d g-5又はそれと同等の活性を有するポリペプチド」を、総称してE d g-5蛋白質等という。

「E d g-5のリガンド」とは、天然に存在するE d g-5のリガンドであるS P P、S P Pと同様にE d g-5に結合して図1に記載の細胞増殖シグナルを伝達させる活性を有するS P P類似化合物を指す。そのようなリガンドは、E d g-5溶液を用いた結合実験によって得ることができる。S P PはE d g-5の天然のリガンドであり、E d g-5を発現する細胞の増殖を刺激することが明らかであることから本発明方法にとって好ましいリガンドである。

本発明のスクリーニング方法で得られる物質は増殖性糸球体腎炎の予防・治療薬として有用でありうることから、本明細書中では抗I G A N薬 (anti-IGAN drug) と称する。なお、本発明の抗I G A N薬の内、リガンドとE d g-5との結合を阻害する物質を「E d g-5アンタゴニスト」と呼称することもある。本発明の抗I G A N薬はE d g-5とリガンドとの結合反応を阻害し、又は、一連のシグナル伝達機構の抑制を介してE d g-5遺伝子の上方制御を抑制することにより、メサングウム細胞の増殖を阻止しI G A Nの治療・予防効果を発揮する。

本発明方法の対象である抗I G A N薬、E d g-5とリガンドとの結合を阻害するE d g-5アンタゴニスト、アンタゴニストの候補となる物質には特に限定がなく、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが含まれる。これらの物質は新規物質であってもよいし、公知物質であってもよい。一例として、WO 99/54351、WO 00/60056に記載のE d g-5に対するモノクローナル抗体が挙げられる。

本発明のスクリーニング方法で得られるE d g-5の活性化の抑制作用を有する化合物は増殖性糸球体腎炎以外のE d g-5による他の細胞シグナル伝達機構にも有効である。

本発明のスクリーニング方法で得られた抗I G A N薬は、次いで、医薬として

の有用性（バイオアベイラビリティ、製剤設計上の条件など）に関して必要とされる種々の試験に供し、最終的に増殖性糸球体腎炎の予防又は治療のための医薬として用いることができる。そのような試験の種類及び方法は、使用目的に応じて、当該技術分野で既知のものから、適宜選択することができる。例えば、急性毒性、投与形態に応じた特性（溶解性）等が含まれる。

本発明のスクリーニング方法には、Edg-5蛋白質等を含有する細胞、該細胞由来の細胞膜画分若しくは単離された蛋白質を用いることができる。Edg-5蛋白質等を含有する細胞は、上記の定義に従い、Edg-5蛋白質等を産生している細胞であり、天然のEdg-5産生細胞及びDNA組換え技術で得られた組換え体を含む。前者の例として、メサングウム細胞、例えば、HIGAマウスの腎臓由来のメサングウム細胞を挙げることができる。後者は、Edg-5蛋白質等をコードするポリヌクレオチド（RNA及びDNAを包含する）が導入され、それを発現して活性なEdg-5蛋白質等を産生している形質転換体を指す。

本明細書中、「ポリヌクレオチド」とは、修飾された、または修飾されていないRNAもしくはDNAを含む任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを意味する。「ポリヌクレオチド」は、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物または一本鎖、二本鎖および三本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖もしくはより通常的には二本鎖もしくは三本鎖、または一本鎖および二本鎖領域の混合物等の、DNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を含む。

形質転換細胞は、後述の実施例にも記載したように、Edg-5蛋白質等をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターで宿主細胞を形質転換することにより得られる。そのような方法は当該技術分野で既知であり、例えば、Davisら、Basic Methods in Molecular Biology (1986) ; Sambrookら、Molecular Cloning ; A Laboratory Manual、第2版 ; コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク (1989) などに記載の方法を参照して行うことができる。

ポリヌクレオチドは、Edg-5蛋白質等をコードする限り、任意のヌクレオチド配列を有するものであって良いが、好ましくは配列表の配列番号2、4又は6に記載のヌクレオチド配列を有するDNA又はこれらとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうるDNAである。ここに、ストリンジェントな条件とは上記のモレキュラークロニング：ア ラボラトリー・マニュアル第2版などに記載の条件が挙げられる。例えば、ハイブリダイズの条件は、50%ホルムアミドを含む6XSSC中で42℃、24時間等であり、洗浄の条件は、0.1XSSC、68℃、30分等である。

宿主細胞も任意であり、大腸菌等の細菌細胞、酵母細胞等の真菌細胞、ショウジョウバエS2 (Drosophila S2) 等の昆虫細胞、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO)、ヒト胎児性腎臓由来細胞 (HEK293)、COS、HeLa等の動物細胞が挙げられ、中でもCHOおよびHEK293が好ましい。

それぞれの宿主に適したベクターも上記の教科書に記載されており、また当業者にとって既知であるが、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110)、酵母由来のプラスミド (例、pSH19)、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、パキウウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pCI-NEO (Gene Bank Accession No. U47120)、pCDNA3.1 (Invitrogen) などが用いられる。

宿主が哺乳動物細胞の場合、ベクターはpCI-NEOまたはpCDNA3.1が好ましい。

プロモーターは、Edg-5遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。

形質転換の方法も当該技術分野で既知であり、例えば動物細胞を形質転換するには、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。このようにして、Edg-5蛋白質をコ

ードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体  
が得られる。該形質転換体はそれを適当な培地で培養すると E d g - 5 を細胞表  
面に発現する。

形質転換体の培地、培養条件は当該技術分野で既知であり、当業者が適宜選択  
5 することができる。例えば、宿主が動物細胞である形質転換体の場合、MEMダル  
ベッコ培地、RPMI1640培地、ハムF-12培地を用いることができ、MEMダルベッコ  
培地が好ましい。また pH は、約 7.4 付近が好ましい。培養は通常、約 20℃～  
42℃で約2時間から2日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のよ  
うにして、形質転換体の細胞膜に E d g - 5 受容体蛋白を生成させることができ  
10 る。

本発明のスクリーニング方法には、上記の E d g - 5 蛋白質等を含有する細胞  
そのものを用いるのみならず、該蛋白質等を含有する細胞膜画分、及び組換え E  
d g - 5 蛋白質等を用いることができる。

また、E d g - 5 蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルア  
15 ルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方  
法に従って行なうことができる。

本発明の E d g - 5 蛋白質等を含有する細胞としては、該蛋白質等を発現して  
いる宿主細胞を指し、上記のメサンギウム細胞や形質転換体が挙げられる。

本発明方法に用いる細胞は、細胞表面に E d g - 5 又は E d g - 5 と同等の活  
20 性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質を発現  
しており、該リガンド結合領域にリガンドが結合することによって増殖を刺激さ  
れる細胞であり、細胞膜画分はそのような細胞から常法に従って得ることができ  
る。

細胞膜画分は、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多  
25 く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホ  
モジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン

(Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧  
しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細  
胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画

法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜面分とする。該膜面分中には、発現したEdg-5蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。なお、発現量が多いほど膜面分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

組換えEdg-5蛋白質等は、大腸菌等で発現させたEdg-5DNAの発現産物を常法通り単離精製することにより得ることができる。

一つの態様では、本発明のスクリーニング方法は、Edg-5蛋白質等とリガンドとを接触させた場合と、Edg-5蛋白質等、リガンドおよび試験物質とを接触させた場合との比較を行なうことによって実施することができる。

試験物質の存在下で、リガンドのEdg-5活性化作用が阻害されていれば、その物質は抗IGAN薬の候補である。

試験物質の存在下又は非存在下で、リガンドとEdg-5蛋白質等を接触させる方法は、Edg-5蛋白質等を含有する細胞、又は該細胞から調製されるEdg-5蛋白質等を含有する細胞膜面分又はEdg-5蛋白質等を用いて行うことができる。

比較は、①Edg-5又はそれと同等のポリペプチドを含有する細胞に対するリガンドの刺激活性（シグナル伝達作用）の変化、②Edg-5又はそれと同等のポリペプチドに対するリガンドの結合量の変化、さらには、③細胞内でのEdg-5の発現・産生量の変化等に基づいて行うことができる。

①Edg-5又はそれと同等のポリペプチドを含有する細胞に対するリガンドの刺激活性（シグナル伝達作用）の変化に基づく方法

より具体的には、本発明は、Edg-5のリガンド（例えばSPP）をEdg-5蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、Edg-5のリガンドと試験化合物をEdg-5蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合におけるEdg-5を介する細胞へのシグナル伝達阻害作用を測定して比較することを含むEdg-5アンタゴニストをスクリーニングする方法を提供する。

シグナル伝達は、例えば、細胞の増殖（細胞数の変化）や、E d g - 5 を介する細胞刺激活性（例えば、細胞内 C a 遊離、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 c AMP 生成、細胞内 c GMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o s の活性化、p H 低下をもたらす物質の産生を抑制する活性などを公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することにより実施できる。E d g - 5 蛋白質等を含有する細胞は、メサングウム細胞等のそれ自身が E d g - 5 を産生する細胞、上記の形質転換体等を含む。

上記の方法を実施するには、まず、本発明の E d g - 5 蛋白質等を細胞膜表面に発現する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、培養後の細胞数を計数するか、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、カルシウムイオン、p H 低下物質）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、c AMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞数の測定には、市販の XTT 細胞増殖アッセイキット（ロシュ ダイアグノスティクス社）を用いて行う。このキットを用いて得られる結果は、増殖細胞数と強く相関している。

酸性化物質の酸性に対する阻害活性は、市販のマイクロフィジオメーターを用いて行うことができる。これは、酸性化物質は、シグナル応答に対応して細胞内シグナリングプロセスを活性化するために必要な代謝活性が増大し、微少の酸性物質が排出されることによる。よって、細胞のシグナル応答（代謝の活性化、増殖）を細胞外液の酸性化率（p H 変化）に基いて検出することができる。そのような p H 変化は市販の装置、例えば、シリコンセンサーチップを用いるサイトセンサー（モレキュラー デバイス社）で検出することができる。



また、細胞外刺激を受けると細胞内カルシウム濃度が一時的に上昇するので、 $\text{Ca}^{2+}$ イオンも、細胞刺激伝達の指標となる。 $\text{Ca}^{2+}$ イオンも市販の装置で測定することができ、たとえばFLIPRシステム (Fluorometric Imaging Plate Reader、モレキュラー・デバイス社) が使用可能である。

5      ②Edg-5又はそれと同等のポリペプチドに対するリガンドの結合量の変化に基づく方法

より具体的には、本発明は、標識したリガンドを、Edg-5蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をEdg-5蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該Edg-5蛋白質等に対する結合量を測定し、比較すること；標識したリガンドを、Edg-5蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をEdg-5蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較すること；標識したリガンドを、Edg-5をコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したEdg-5蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本Edg-5をコードするポリヌクレオチドを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したEdg-5蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該Edg-5蛋白質等に対する結合量を測定し、比較すること、を含むスクリーニング方法を提供する。

上記方法には既述の動物由来の細胞、形質転換体、細胞膜画分、組換えEdg-5蛋白質等を用いることができる。細胞は固定化されていても良い。

標識したリガンドとしては、当該技術分野で既知の方法で標識されたリガンドを用いることができ、例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ などで標識されたリガンドが挙げられる。具体的には、Edg-5蛋白質等を含有する細胞または細胞膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりEdg-5標品を調製する。バッファーには、 $\text{pH}4\sim10$ （望ましくは $\text{pH}6\sim8$ ）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとEdg-5との結合を阻害しないバッファーを用いる。非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、

Tween-80™ (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~2mlのEdg-5溶液に、一定量の標識したリガンドを添加し、同時に10nMの試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えて同様に反応させる。反応は約0℃から37℃で、約10分から4時間、好ましくは約30分から2時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。試験物質がない場合のカウント( $B_0$ )から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント( $B_0 - NSB$ )を100%とした時、特異的結合量( $B - NSB$ )が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択する。

### ③細胞内でのEdg-5の発現・産生量の変化に基づく方法

#### ③-1 mRNA量の変化

より具体的には、本発明は、例えば、ヒト以外の哺乳動物の血液、特定の臓器、該臓器から単離した組織若しくは細胞、または(ii)形質転換体等に含まれるEdg-5蛋白質等のmRNA量を測定することを含むEdg-5アンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

Edg-5蛋白質等のmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なうことができる。正常あるいは疾患モデル動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より好ましくはIGANのモデルマウスであるHIGAマウス)に対して、試験物質を投与し、一定時間(例えば、数時間~数週間、好ましくは4時間)経過した後、血液、あるいは特定の臓器(腎臓)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた細胞に含まれるEdg-5蛋白質等のmRNAを、TaqManPCRなどの手法を用いることにより、あるいは自体既知のノザンプロットを行って解析する。

あるいは、Edg-5蛋白質等を発現する形質転換体を前述の方法に従い作製

し、培養する際に試験物質を培地中に混合させ、一定時間培養後（数時間～数日、好ましくは4時間）、該形質転換体に含まれるE d g-5蛋白質等のmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

### ③-2 E d g-5蛋白質等の量の変化

より具体的には、本発明は、例えば、(i) ヒト以外の哺乳動物の臓器、該臓器から単離した組織若しくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれるE d g-5蛋白質等を定量することを含む、E d g-5アンタゴニストのスクリーニング方法、(ii) E d g-5蛋白質等を発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれるE d g-5蛋白質等を定量することを含む、E d g-5アンタゴニストのスクリーニング方法、(iii) ヒト以外の哺乳動物の臓器、該臓器から単離した組織若しくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層でのE d g-5蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することを含む、E d g-5アンタゴニストのスクリーニング方法、(iv) E d g-5蛋白質等を発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することを含むE d g-5アンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

細胞膜画分に含まれるE d g-5蛋白質等の定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル動物（正常あるいは疾患モデル動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より好ましくはIGANのモデルマウスであるHIGAマウス）に対して、試験物質を投与し、一定時間（例えば、数時間～数週間、好ましくは4時間）経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば腎臓）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトンX100™、ツイーン20™など）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手

法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎は上記した方法と同様にして行う。最終的に得られた該膜画分中には、発現したE d g-5蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。細胞膜画分に含まれるE d g-5蛋白質は、例えば、E d g-5に対する抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などにより定量することができる。かかるサンドイッチ免疫測定法は自体既知の方法で行うことができ、ウエスタンブロットは自体公知の手段により行なうことができる。抗体の取得及び該抗体の使用方法は既知である（例えば、W099/54351、W000/60056参照）。

(ii) E d g-5蛋白質等を発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれるE d g-5蛋白質等を定量することができる。即ち、E d g-5蛋白質等を発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、培養する際に試験物質を培地中に混合させ、一定時間培養後（数時間～数日、好ましくは4時間）、細胞膜におけるE d g-5蛋白質等を上記と同様に定量することにより行なうことができる。

また、別の態様として、本発明のスクリーニング方法は、E d g-5を発現しうる細胞におけるE d g-5の産生量又はmRNA量を定量することによって実施することができる。この方法は、上記「③細胞内でのE d g-5の発現・産生量の変化に基づく方法」の欄に記載の方法に順じて行うことができる。

本発明はまた、上記スクリーニング方法を実施するためのキットを提供する。そのようなキットは、スクリーニング方法により異なるが、例えば以下のものからなる。

本発明の抗I G A N薬がE d g-5アンタゴニストである場合、スクリーニング用キットには、E d g-5のリガンドと、E d g-5蛋白質等、E d g-5蛋白質等を含有する細胞、またはE d g-5蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものが含まれる。さらに、使用するスクリーニング方法に応じて、阻害作用の効果を測定するための適当な試薬、装置、キットなども含まれる。

本発明のE d g-5アンタゴニストのスクリーニング用キットの例として、以

下のものが挙げられる。

1. Edg-5蛋白質等を発現させた細胞を96穴プレートに $5 \times 10^4$ 個／穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで1日間培養したもの。

2. 標識リガンド：市販の<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>Sなどで標識したSPP。水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて10nMに希釈する。

3. リガンド標準液：SPPを0.1%FAFウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

4. リガンドのEdg-5蛋白質等に対する活性化作用又は結合を測定するためのキット又は試薬

本発明のキットには、具体的なスクリーニングの方法に応じて、上記の、または上記以外の既知の構成であってよい。後述の実施例では、被検物質存在下での実験と、被検化合物の非存在下での実験を行っているが、予め決定した条件下で、リガンド及びEdg-5発現細胞を用いて測定したEdg-5発現量の変化に基く標準曲線を作成しておき、被検物質の存在下での測定量を該標準曲線と比較することで、阻害作用を判定するのが好都合である。

Edg-5アンタゴニスト以外の抗IGAN薬である場合、キットには適当な標準物質と被検物質とを用いてEdg-5 mRNA又はEdg-5の量を測定するための装置が含まれる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物（Edg-5アンタゴニスト等の抗IGAN薬）は例えばリガンドとEdg-5との結合を阻害することにより、図1で模式的に示したメサングウム細胞の増殖にいたる一連のシグナル伝達機構の活性化を抑制するので、IGANの予防及び治療に有用である。得られた物質は、通常の薬理試験に供され、適当な剤形、例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などに、製剤の分野で既知の固体又は液状担体を用い、所望により、結合剤、賦形剤、潤滑剤、甘味剤、香味剤などと共に製剤化される。

以下に実施例を示して、本発明を詳しく説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

## 実施例1 cDNAマイクロアレイ及びRT-PCRによるIGANの解析

## (1) I G A Nのモデルマウスの作成

I G A Nモデルマウス（以下、H I G Aマウスという）はクローズドコロニーとして市販のddYマウスを用い、選択育種により選抜して得ることができる。

5

## 方法：

1) クローズド・コロニーであるddY系マウス（日本エス・エル・シー株式会社）の雌52匹と雄52匹（G<sub>0</sub>世代）を使用する。これらマウスの4ヶ月齢における血清IgA値の平均（mg/dl）は、雌が27.1±2.2、雄が43.3±3.3であった。

10

2) 雌雄それぞれから高値を示す5匹を選抜し（G<sub>0</sub>選抜個体）、これらを交配することによって次世代（選抜第1代；G<sub>1</sub>世代）を得た。G<sub>0</sub>選抜個体の平均血清IgA値は、雌が65.0±7.9、雄が90.5±2.3であった。G<sub>1</sub>世代における平均血清IgA値（4ヶ月齢）は、雌が44.2±4.0（n=52）、雄が58.4±6.0（n=55）であった。

15

3) 次にG<sub>1</sub>世代より、4ヶ月齢の血清IgA値を指標として6ペアの雌雄を選抜し、それらを交配することによってG<sub>2</sub>世代を得た。G<sub>1</sub>選抜個体の平均血清IgA値は、雌が109.6±12.6、雄が147.8±15.6であり、G<sub>2</sub>世代の平均値（4ヶ月齢）は、雌が161.0±12.0（n=54）、雄が180.4±18.1（n=42）であった。

20

4) 同様に、毎世代4ヶ月齢における血清IgA値を指標とする選抜交配を繰り返した。その結果、第4代で選抜交配による効果は頭打ちになった。なお、G<sub>2</sub>選抜個体の平均血清IgA値は、雌が293.5 ± 28.2、雄が358.9 ± 50.6であり、G<sub>3</sub>世代の平均値（4ヶ月齢）は、雌が159.4 ± 11.9(46)、雄が222.6 ± 27.2(42)であった。さらに、G<sub>3</sub>選抜個体の平均血清IgA値は、雌が235.8 ± 25.3、雄が548.7 ± 130.3であり、G<sub>4</sub>世代の平均値（4ヶ月齢）は、雌が238.5 ± 21.0(50)、雄が214.8 ± 20.3(39)であった。

25

40世代に渡る兄妹交配を経て近交系として育成されたマウス受精卵は、受託番号FERM P-18150の下で、通商産業省生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センター寄託されている（受託日：平成12年12月25日）。

このH I G Aマウスは、①血中のIgA濃度が高いこと、②腎臓の糸球体にIgAが高濃度に沈着すること、③前記②が引き金となって、メサングウム細胞の増殖お

よびメサンギウム基質の造成が起こり、糸球体硬化症を発症することを特徴とする。このHIGAマウスの発症する糸球体腎炎は、ヒトIgA腎症に酷似している。

HIGAマウスは一貫して高い血清IgAレベルを示し、該動物の腎組織には緩やかなメサンギウム細胞の増殖から、細胞外基質の蓄積を伴うメサンギウムの顕著な増大まで各種のメサンギウムの傷害が顕微鏡下で観察される。HIGAマウスはヒトIGANのほぼ全ての臨床的・病理的特徴を示すことから、ヒトIGANの適当な動物モデルであると考えられる。

## (2) HIGAマウス腎臓の組織学的な解析

HIGAマウスの腎臓の重量は6週齢においてはddYマウスとほぼ等しい( $292 \pm 6.1$  vs.  $278 \pm 7.5$  mg,  $n = 4$ )が、25週齢ではHIGAマウスのほうが明らかに大きくなる( $465 \pm 15.2$  vs.  $395 \pm 9.5$  mg,  $n = 4$ ,  $P < 0.01$ )。

HIGAマウスでは約10-25週齢の間にメサンギウム細胞の増殖が観察され、40週齢を過ぎるとメサンギウムの基質の顕著な増大が見られる。この顕微鏡的に病理的な変化を観察できる時期の前後、すなわち6週、25週齢においてHIGAとコントロールとしてのddYについて、組織学的な解析を行った。

6週齢及び25週齢それぞれの雌のHIGAマウスより腎臓を摘出し、パラフィンで包埋を行った。パラフィン切片につきPAS染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察を行った。この組織学的研究において、6週齢では病理的特徴は検出されなかった(図2(A))。一方、25週齢においてはメサンギウム細胞が顕著に増殖し、メサンギウム基質の増大によりボウマン嚢や糸球体の毛細血管が圧迫されていた(図2(B))。

## (3) cDNAマイクロアレイを用いるHIGAマウスの腎臓における遺伝子発現変化の解析

DNAマイクロアレイによる解析は、それぞれ6週齢と25週齢のHIGAマウス及びddYマウスの腎臓より調製したmRNAを鋳型として用いて行った。

実施例に記載のラット腎糸球体のメサンギウム細胞の培養及び各処理、それを用いる標準化腎臓cDNAマイクロアレイの作製、cDNAプローブの調製、ハイブリダイゼーションとマイクロアレイの蛍光強度の測定、及び半定量的RT-PCRは以下の方法で行った。

## 1) メサングウム細胞の培養及び各処理

常法に従いラット腎系球体のメサングウム細胞の培養を行った。細胞の培養には10%(v/v)ウシ胎児血清(FCS)を添加したRPMI1640を用いた。6穴プレートで培養したメサングウム細胞に16-24時間スタベーションをかけ、成長因子若しくはSPPを添加した、0.4% FAF(Fatty Acid Free)-BSAを含む無血清のRPMI1640でインキュベーションすることにより、このSPP処理を行った。各処理の2、4、8、26時間後にXTT assay kit (ロッシェ・ダイアグノティクス社)を用いてメサングウム細胞の増殖を測定した。また、各処理の0.5、2、4、8、26時間後にIsogen (ニッポンジーン)を用い、添付の指示に従い、total RNAの単離を行った。

## 2) 標準化腎臓cDNAマイクロアレイの作製

Bonaldo et alの方法(USP5702898)に一部改良を施して標準化cDNAマイクロアレイを作成した。詳細は、本出願人による特願2000-329998に記載されている。即ち、cDNAライブラリーより調製したDNA溶液を酵素処理により環状一本鎖DNA化し、別にライブラリーよりPCR法で調製したビオチン化DNAとハイブリダイズさせ、ビオチン化DNAとハイブリダイズしたものを除き、残った環状一本鎖DNAライブラリーを二本鎖化し、大腸菌を形質転換するか、あるいは、cDNAライブラリーより調製したDNA溶液を酵素処理により環状一本鎖DNA化し、別にライブラリーより調製した相補的なビオチン化RNAとハイブリダイズさせ、ビオチン化RNAとハイブリダイズしたものを除き、残った環状一本鎖DNAライブラリーを二本鎖化し、大腸菌を形質転換する方法、のいずれによって得ることができる。なお、DNA溶液の環状一本鎖化、DNAのビオチン化、ハイブリダイゼーション、及び環状一本鎖ライブラリーの二本鎖化、大腸菌の形質転換は、当該技術分野で既知の方法に従い、当業者が入手可能な酵素や培地等を用いて行うことができる。

作成した標準化腎臓cDNAライブラリーより、大腸菌のクローンを無作為に4,224個単離した。これらのクローン全部の部分塩基配列決定を行い、アレイにスポットしたユニークなクローンの数を見積もったところ2,878クローンであった。



### 3) プローブの調製

上記1) の成長因子処理した細胞からそれぞれ2  $\mu$ gのpoly(A)+ RNAよりCy3-またはCy5-と結合したdUTP (アマシャムファルマシア社) を基質に、Superscript II reverse transcriptase (ライフテクノロジー社) を用い、供給者指定の条件下で37℃、30分間、逆転写反応を行った。その後、ラベルしたプローブを  
5 Microconフィルター (ミリポア社) で濃縮し、10  $\mu$ lのハイブリダイゼーション液 (0.3% SDS、20  $\mu$ g poly(A)+ DNA、20  $\mu$ g 酵母tRNAを含む3.4 X SSC) で希釈した後マイクロアレイとのハイブリダイゼーションに用いた。

### 4) ハイブリダイゼーションとマイクロアレイの蛍光強度の測定

cDNAマイクロアレイに対し、上記3) の方法で調製した、ラベルしたプローブを用いて65℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。洗浄はカバーガラスをはずした後、2 x SSC (0.5% SDSを含む) を用いて室温で5分間2回洗い、引き  
10 続いて0.2 x SSC (0.5% SDSを含む) を用いて40℃で3分間、最後に0.2 x SSCを用いて3分間洗浄を行った。低速遠心によりスライドガラスを乾燥させた後、スキャンアレイ5000 (ビーエム機器) で蛍光強度を測定し、Array Gauge (富士フ  
15 ィルム) を用いて解析を行った。

### 5) 半定量的RT-PCR

半定量的RT-PCRは、RT-PCRと同様にして行うが、内部標準を設け、PCR反応で産物が増えるサイクル数をあらかじめ決めておいてその範囲で増幅反応  
20 を行う点において異なる。

mRNAは上記と同様の条件下で37℃、30分間、逆転写反応を行い、希釈した後、プラチナPCRスーパーミックス (ライフテクノロジー社) を用いて、供給者指定の条件に従って行った。反応液の組成は、プラチナPCRスーパーミックス 45  $\mu$ l、鋳型DNA 1  $\mu$ l、プライマー 各10  $\mu$ Mである。12から2  
25 5サイクルの間でcDNA断片を増幅し、各反応において半定量的解析を行う対数期を決定した。PCRプライマーを報告されている配列 (GenBank) の配列情報に従って合成した。PCR産物は適当な制限酵素で消化し、増幅したPCR産物が目的のものと一致するかどうかの確認を行った。PCR産物の濃度解析は、画像解析ソフトMacBAS v. 2.51 (富士写真フイルム) を使用し、発現量が一定であ

るとされているRibosomal S9、 $\beta$ -アクチンおよびGAPDH遺伝子の発現量を同時に測定して、サンプルごとの操作由来の誤差を補正した。

使用したプライマーは、マウス及びラットのEdgファミリーの遺伝子の配列情報 (GenBank) に従って合成した。各プライマーの配列を以下の表及び配列番号7～38に示す。

表 1

起源		プライマー	配列番号
マウス	Edg1	FW 5-ATC AGC TCG CTG TCT AGC	7
		RV 5-TAG GAA GAA GAA TTG ACG	8
	Edg2	FW 5-CTG CTG GCT ATT GCT ATC	9
		RV 5-AAC ACA GGA TCT GCC TGA	10
	Edg3	FW 5-CTG ACC ATG ATC AAG ATG	11
		RV 5-GTT CTG AAA CGA CCT GTT	12
	Edg4	FW 5-TTG CTA CCT GCA CAC TTC	13
		RV 5-CAC ATG CAG CAG AGA AGG	14
	Edg5	FW 5-TGG AAT TGT CTG AAC CAG	15
		RV 5-TCA GAC CAC TGT GTT ACC	16
	Edg6	FW 5-ATC GGT CTG TGC TGG CTA	17
		RV 5-CTA GGT GCT GCG CAC GCT	18
	Edg7	FW 5-ATG AGT GTC ACT ATG ACA	19
		RV 5-GTT GCA GAG GCA ATT CCA	20
	Edg8	FW 5-TAT GTG CTC TTC TGC GTG	21
		RV 5-TCA GTC TGT AGC ATC AGG	22
ラット	Edg1	FW 5-TGT TCA TTC TCA TCT GCT GC	23
		RV 5-TAT AGT GCT TGT GGT AGA GC	24
	Edg2	FW 5-GCC ACA GAA TGG AAC ACA GT	25
		RV 5-CCA GAA CTA TGC CGA GAC AT	26
	Edg3	FW 5-TCA TTG GCA ACT TGG CTC TC	27
		RV 5-CCA GCA TGA TGA ACC ACT GA	28
	Edg4	FW 5-TGC TGA CCA ATC TGC TGG T	29
		RV 5-AGT AGG AAG ACA AGC AGG CT	30
	Edg5	FW 5-GCC ATC GCC AAG GTC AAG CT	31
		RV 5-ACT GTG TTG CCC TCC AGA AA	32
	Edg6	FW 5-GGC ATG GAC TGG ATC CTG	33
		RV 5-CAG ACT CAC TGG ATC TGG AT	34
	Edg7	FW 5-TGA GTG TCA CTA TGA CAA GC	35
		RV 5-ATG TTG CAG AGG CAA TTC CA	36
	Edg8	FW 5-TGC TCT TCT GCG TGC TGG	37
		RV 5-AAA CTG TTG GAG GAG TCT TG	38

(i) cDNAアレイを用いる I G A Nモデルマウスの腎臓における遺伝子発現変化の解析

H I G Aマウスと、年齢および性別が等しいコントロールddYマウスの腎臓から調製したmRNAを用いて、上記2)～4に記載の方法に従ってハイブリダイゼーションを行い、マイクロアレイの蛍光光度を測定した。

解析の結果、図3に示すようにH I G Aマウスの遺伝子発現パターンは、コントロールに比べて25週齢よりも6週齢において散乱の程度が大きいことが分かった。これは、組織学的な変化が観察される前に多くの遺伝子が差動的に発現 (differential gene expression) することを表している。6週齢と25週齢の H I G Aマウス腎臓で差動的に発現するcDNAクローンをそれぞれ553クローン、156クローンずつ同定し、それらの70%以上は発現が増加するものであることを見出した。これら差動的に発現する遺伝子をデータベースにより調べたところ、92クローン及び22クローン（それぞれ6週齢、25週齢）がGenBankのESTとのみマッチするものであり、65クローン及び28クローンはGenBankでマッチするものがなかった。差動的に発現する遺伝子のうち、成長因子やその受容体及び細胞増殖に関連する分子の発現が増加しており、その発現プロファイルは、H I G Aマウス腎臓における異常な細胞増殖に対する自己防御のメカニズムを反映していると考えられた（表2参照）。

表 2

腎臓標準化マイクロアレイを用いる遺伝子発現分析

遺伝子	相対的な発現 (HIGA/ddy)	
	6 週齢	2 5 週齢
細胞周期、増殖		
抗増殖性抗体 (TAPA) の標的	1.7	1.0
Growth arrest specific 1 (Gas1)	1.5	1.5
サイクリン D 1	3.4	1.8
サイクリン G	1.8	0.9
抗増殖性因子(BTG1)	1.6	1.1
増殖因子		
血小板誘導成長因子 A-鎖 (PDGF-A)	1.3	1.1
グリア誘導神経栄養成長因子 (GDNF)	1.6	1.1
血管内皮成長因子(VEGF)	1.4	1.4
表皮成長因子 (EGF)	1.3	0.9
成長因子受容体		
線維芽細胞成長因子受容体2(FGFR2)	2.7	1.2
線維芽細胞成長因子受容体3(FGFR3)	1.0	1.5
アルファ血小板由来成長因子受容体(PDGF R-A)	1.5	1.7
VEGF受容体-2 (FLK-1)	1.4	1.6
G 蛋白質結合レセプター		
H218,内皮分化遺伝子5(edg-5)	3.0	1.7
ロイコトリエンB4受容体(BLT)	1.6	1.2
5-ヒドロキシトリプタミン受容体(5HT-2)	1.4	1.1

- 関連する遺伝子群の1つは成長因子やその受容体でありメサンギウム細胞において強力な分裂促進効果を持つと報告されているものであり、もう一つの遺伝子群はGPCR (G蛋白質共役型受容体) であり、化学誘引性の脂質メディエーターであるロイコトリエンB<sub>4</sub>に対する受容体、5-ヒドロキシトリプタミン受容体(5HT-2)、SPP受容体であるEdg-5が含まれる。

発現データから得られる特定のパターンの数々は、IGANにおいて起こって

いる反応を反映しているものと考えられる。特に、細胞周期や細胞増殖の制御に関与する幾つかの遺伝子の発現変化が多く見られた。それらの多くは成長因子やその受容体であり I G A N 患者の腎臓において PDGF 及び PDGF 受容体の発現の上昇が見られるという臨床における知見と一致する。そして、マイクロアレイの結果をもとに PDGF 誘導によるメサンギウム細胞の増殖において顕著な Edg-5 のアップレギュレーションが見られることを見出した。これらのことを統合すると、疾患の進行を促進する新規の PDGF/PDGF 受容体- Edg-5 パスウェイを想定することができる。(図 1)

(ii) RT-PCR による Edg ファミリーの発現レベルの解析

Edg ファミリーの 8 つのサブタイプの発現レベルについて、サブタイプ特異的プライマーを用いた RT-PCR により解析を行った。RT-PCR は、上記表 1 に記載の PCT プライマーを用い、5) に記載の半定量的 RT-PCR と同様の条件下で行った。

結果を図 4 に示す。図 4 において、(A) は 6 週齢 (6W) 及び 25 週齢 (25W) の H I G A マウスと、該 H I G A マウスと年齢及び性別が等しい d d y マウスの腎臓から調製した mRNA を用いて Edg ファミリーの 8 つのサブタイプの発現レベルについて解析した結果を示す写真の模写図である。(B) は (A) に示した結果を H I G A / d d y の比で表したグラフである。(A) から、Edg-8 を除くすべての Edg ファミリーメンバーが腎臓において検出可能であることが分かる。また、(B) から、6 週齢では幾つかの Edg サブタイプが d d y に比べ H I G A マウスで上方制御されていること、特に Edg-5 と Edg-6 の発現が H I G A マウスでは d d y マウスの数倍まで上昇していることが明らかである。一方、25 週齢ではそれぞれの Edg サブタイプの発現について十分な変化は見られない。これは、Edg ファミリーの上方制御が I G A N の早い段階で起こっていることを示唆している。なお、Edg-6 は血小板における主要な S P P 受容体サブタイプであることから、上記 6 週目での上方制御には、実験で用いた mRNA が浸潤した血小板由来の Edg-6 転写物が関与していると考えられる。これは、血小板で特異的に発現することが知られている血小板因子 4 (platelet factor 4) の mRNA も同様に増幅されたことによって裏付けられた。

(iii) マウス腎臓由来のE d g ファミリーの半定量的R T - P C Rによる解析  
上記の方法でH I G Aマウスの腎臓由来のmRNAについて半定量的R T - P C  
Rを行った。その結果、表2に示すように、PDGF、bFGF、EGFをコー  
ドする遺伝子も、それぞれの受容体と同様に発現が増加していることが確認され  
た。また、この実験によりそれぞれの分子の遺伝子発現についても詳細に得るこ  
とができ、このR T - P C Rで得られた遺伝子発現パターン変化は全体的にマイ  
クロアレイの結果と高い相関を示すものであった。

(iv) PDGF誘導増殖性ラットメサンギウム培養細胞におけるE d g - 5の上  
方制御

PDGF-BBのような成長因子は、メサンギウム細胞においてスフィンゴミ  
エリナーゼやセラミナーゼを活性化し、その結果、新規のS P Pが合成されると  
考えられている (J Biol Chem 1995 Oct 6;270(40):23305-9 Differential  
regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth  
factors and cytokines. Implication for cellular proliferation and  
differentiation Coroneos E, Martinez M, McKenna S, Kester M)。上記のH  
I G Aマウス腎臓におけるPDGFとPDGF受容体の発現上昇は、PDGFが  
メサンギウム細胞においてS P Pの合成だけではなくS P P受容体の発現にも影  
響を及ぼしていることを示唆している。そこで、ラットのメサンギウム培養細胞  
を用いてE d g 遺伝子の発現に対する成長因子の効果について解析した。

上記1)の方法に従いラット腎系球体のメサンギウム細胞の培養を行った。即  
ち、10%(v/v)ウシ胎児血清 (FCS) を添加したRPMI1640を用いて培養した。6穴  
プレートで培養したメサンギウム細胞 ( $5 \times 10^4$  cells/ウェル) に16-24時間  
スタベーションをかけ、成長因子を添加した無血清のRPMI1640により処理を行っ  
た。S P P処理の際には、0.4% FAF-BSAを含む無血清のRPMI1640を用いた。各処  
理の2、4、8、26時間後にXTT assay kit (ロッシェ・ダイアグノティクス社)を  
用いてメサンギウム細胞の増殖を測定した。また、各処理の0.5、2、4、8、26時  
間後にIsogen (ニッポンジーン) を用いて total RNAの単離を行った。

具体的には、10 ng/ml PDGF-BB、10 ng/ml bFGF、20 ng/ml EGF  
を加えて、0.5、2、4及び8時間培養して刺激した。その結果、表3に示すように

PDGF-BBによる2時間刺激の場合に、Edg-5の発現が誘導された。

表 3

成長因子によるEdgの誘導			
Edgサブタイプ	PDGF-BB (10 ng/ml)	bFGF (10 ng/ml)	EGF (20 ng/ml)
Edg-1	1.6±0.38	0.8±0.35	0.9±0.06
Edg-2	1.3±0.16	1.4±0.11	1.0±0.24
Edg-3	1.1±0.21	1.1±0.24	1.3±0.32
Edg-5	2.4±0.52*	1.5±0.15	1.5±0.45

メサンギウム細胞を記載の成長因子で2時間刺激した。発現の割合 $\beta$ アクチンで標準化した。数値は、それぞれ3回行った独立した3つの実験の平均± S. E. M. で表した。\*P<0.05 (対コントロール)

なお、高濃度のPDGF (40ng/ml) の2時間の刺激では、中程度のEdg-1、Edg-3のアップレギュレーション(2時間で、 $1.9 \pm 0.43$ -及び $1.7 \pm 0.45$ -倍、 $n = 3$ )及び十分なEdg-5のアップレギュレーション(2時間で、 $1.8 \pm 0.14$ -倍、 $P < 0.05$ ,  $n = 3$ )が誘導された。しかし、成長因子による刺激の効果は、Edg-4、Edg-6、Edg-7の発現については検出できなかった。

次いで、種々の成長因子の細胞増殖における効果についても研究を行った。図5に示すようにPDGF-BB (10 ng/ml)、bFGF (10 ng/ml)のメサンギウム細胞増殖における効果はEGF (20 ng/ml)よりも顕著であった(図中、黒四角はbFGF、黒三角はPDGF-BB、黒丸はEGFを表す)。

また、既にメサンギウム細胞増殖に関与していると報告されている最初期遺伝子の発現についても実験を行ったところ、c-fosとearly growth response gene-1は、これら全ての成長因子によって0.5時間刺激後アップレギュレートを示し、特にPDGF-BBの効果が際立っていた。

上記と同様に、スタベーションをかけた後、成長因子の代りにSPPを添加したRPMI1640を用い、同様に実験した。その結果、 $10 \mu\text{l}$ の濃度で添加したときSPPはメサンギウム細胞の増殖及び最初期遺伝子の発現に大きな効果を及ぼした。

(26時間で1.2倍、 $P < 0.05$ 、 $n = 3$ )。しかしEdgファミリー受容体の発現におけるSPPの効果については検出することができなかった。

以上のように、マイクロアレイ及びRT-PCRの解析によりHIGAマウス腎臓において、メサンギウム細胞の増殖が観察される前にEdgファミリー、特にEdg-5が発現の増加を示すことが明らかになった。現在まで、SPP (Edg-1、3、5、6、8)とリゾフォスファチジン酸 (Edg-2、4、7)に高い親和性を持つ受容体である8つのGPCRがEdgファミリーとして同定されている。上記の結果は、SPPはEdg-1、Edg-3、Edg-5を経てメサンギウム細胞の増殖を誘導する。加えて増殖性メサンギウム細胞において、PDGFがこれらのEdg受容体特にEdg-5をアップレギュレートしていることを初めて示すものである。Edg-5は、ラットの褐色細胞種PC12細胞においてSPP誘導による神経突起の後退や細胞の円唇化を仲介すること、ラットHTC4肝細胞腫細胞において細胞増殖及び抗アポトーシス作用を示すことが報告されているが、Edg-5のIGANにおける役割については未だ知られていない。

HIGAマウス、DNAマイクロアレイ及びRT-PCRを用いた、PDGF誘導下でのEdg-5アップレギュレーションに関連する一連のシグナル伝達機序を図1に模式的に示した。即ち、PDGFで刺激するとメサンギウム細胞はさらにPDGFを生産・放出し、オートクライン及びパラクラインの機構によって細胞表面のPDGF受容体の発現が増加する。そして、PDGFはメサンギウム細胞のスフィンゴミエリナーゼとセラミダーゼを活性化し、その結果SPPの合成が増加する。一方、SPPは活性化した若しくは凝集性の血小板からも放出される。図1に示すように、SPPはオートクラインでまたは分子内のセカンドメッセンジャーとして働くことにより、メサンギウム細胞の増殖を引き起こすと考えられる。リガンドであるSPPとその受容体Edg-1、Edg-3、Edg-5 (特にEdg-5)の合成量は相乗的に増加しうる。HIGAマウス腎臓で観察されたPDGF/PDGF受容体とEdg-5の発現の増大は、細胞増殖活性につながる成長因子シグナルとリンクするカスケードの増幅のために、PDGF-SPP-Edgパスウェイが正のフィードバックループ中で作用している可能性を示唆している。実験結果はまた、メサンギウム細胞からのSPPはEdg-5の



発現上昇を通して血小板を活性化し、血小板からのSPPの分泌も促進するとい  
うように、IGANの進行中正のフィードバックループ内で次々に作用が起こる  
ことを示唆している。そして、これらの悪循環のすべてがHIGAマウス腎臓に  
5 おいて作動していることが増殖性糸球体腎炎の治療困難性の一因であると考えら  
れる。

このように、上記の実験結果は、Edg-5とリガンド(SPP)との結合阻  
害物質(Edg-5アンタゴニスト)が、増殖性糸球体腎炎、特にIGANの予  
防・治療薬の開発に重要な役割を果たすことを示すものである。

#### 実施例2 マイクロフィジオメーターによるスクリーニング

##### (i) ほ乳類培養細胞での発現

Edg-5受容体を、ヒト胎児性腎臓由来細胞(HEK293)あるいは、チャイ  
ニーズハムスター卵巣由来細胞(CHO)で発現させる。

高頻度に受容体を発現させるために、配列番号1に記載のヌクレオチド配列の  
うち、5'あるいは、3'の非転写領域を全て除き、真核細胞の発現ベクター  
15 である、pCI-NEO(プロメガ株式会社)又はpCDNA3.1(Invitrogen)に  
連結する。

当該遺伝子を連結したpCI-Neoあるいは、pcDNA3.1をLipofectamine Plus  
Reagent(Life Technologies社製)を用い、添付文書の条件に従って培養細胞、  
HEK293あるいはCHOに対する形質導入を行い、以後の検討に用いる。ベクターの  
20 みを導入したHEK293あるいは、CHOをネガティブコントロールとして用いる。

また、形質導入細胞を選択する場合には、細胞を400mg/mlのG418を含む細胞培  
養用培地中で3週間選択培養を行なう。G418耐性の24クローンを選択し、  
実施例1に記載のごとく、RT-PCR法でEdg-5受容体遺伝子を安定に発  
現している細胞を選択する。選択した細胞を96穴の細胞培養用プレートを用い  
25 て1個の細胞より、増殖させたクローンを再選択して、以後の検討に用いる。ベ  
クターのみを導入したHEK293あるいは、CHOを同時に作製し、ネガティブコント  
ロールとして用いる。

(ii) マイクロフィジオメーター(サイトセンサー)によるスクリーニング  
種々の細胞のシグナル応答に対応して、細胞より、微少な、酸性物質が排出さ

れる。これは、細胞内のシグナリングプロセスを活性化するために必要な代謝活性の増大によるものである。サイトセンサー（モレキュラー・デバイス社）は、生細胞の代謝変化で発生する細胞外液の酸性化率（pH変化）を、シリコンセンサーチップを用いて検出することで細胞のシグナル応答を測定することができる。

5      マイクロフィジオメーターとしてサイトセンサーを用いて、細胞表面に発現させた受容体への、リガンド結合による受容体の活性化を検出する。

Edg-5受容体の天然のリガンドであるスフィンゴシン 1-リン酸（SPP）と同時に種々の化合物を細胞外液に加えることによって、SPPの活性を阻害するアンタゴニストをスクリーニングすることができる。

#### 10      実施例3    $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度変化によるスクリーニング

##### （i）ほ乳類培養細胞での発現

Edg-5受容体遺伝子を安定に発現している細胞の選択は、「マイクロフィジオメーターによるスクリーニング」の（i）で記載した方法と同様に行なった。

##### 15      （ii）FLIPRシステムによるスクリーニング

受容体を安定に発現する細胞を、96穴のプレートに $5.5 \times 10^4$  /ウエルの密度で培養し、スタンダード・バッファー（130mM NaCl、2mM  $\text{CaCl}_2$ 、5mM KCl、10mM グルコース、0.45mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、8mM  $\text{MgSO}_4$ 、4.2mM  $\text{NaHCO}_3$ 、20mM HEPES、10 $\mu$ M プロベネシド）中で、Fluo-3 AM（Molecular Probes社）を取り込ませるために、0.1%牛胎児血清存在下で、37℃で1時間インキュベートした後、スタンダード・バッファーで洗浄した。SPPを加えることによる $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度の一時的な変化は、FLIPRシステム（Fluorometric Imaging Plate Reader：モレキュラー・デバイス社）を用いて、96穴のプレートを488nmで測定することによって知ることができる。

20      従って、S1Pと同時に種々の化合物を細胞外液中に加えることによって、SPPの活性を阻害するアンタゴニストをスクリーニングすることができる。

産業上の利用の可能性

本発明方法によれば、E d g-5受容体に対する拮抗作用を含むE d g-5の活性化の抑制作用に基いて、増殖性糸球体腎炎、特にI G A Nの予防・治療に有用な物質を効率よくスクリーニングし、該疾患の新規な治療法の開発に大いに貢献しうる。

## 請 求 の 範 囲

1. 増殖性糸球体腎炎の予防・治療用薬をスクリーニングする方法であって、E d g-5の活性化を抑制する作用に基くことを特徴とする方法。

5 2. E d g-5のリガンドと、E d g-5又はそれと同等のポリペプチドとの結合を阻害する作用に基くことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

3. E d g-5又はそれと同等のポリペプチドが以下の群から選択される、請求項2に記載の方法：

10 ① 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g-5のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、

② 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g-5のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、

15 ③ 配列表の配列番号2、4若しくは6に記載のアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸の欠失、置換、付加若しくは挿入を有するアミノ酸で示されるポリペプチド又はその断片であって、E d g-5のリガンドとの結合活性を有するポリペプチド、及び

④ 前記①～③のいずれかに記載のポリペプチドを含有するポリペプチド。

20 4. 請求項2又は3に記載のポリペプチドを含有する細胞、該細胞由来の細胞膜画分若しくは単離された蛋白質を用いる、請求項2又は3に記載の方法。

5. 前記細胞が、請求項2又は3に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入され、該ポリヌクレオチドを発現している細胞である、請求項4に記載の方法。

25 6. 前記ポリヌクレオチドが以下の群から選択される、請求項5に記載の方法：

① 配列表の配列番号1、3若しくは5に記載の塩基配列で示されるポリヌクレオチド；

② 配列表の配列番号1、3若しくは5に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドに対してその全長にわたり少なくとも80%の同一性を有するポリヌクレ

オチド；

③ 配列表の配列番号1、3若しくは5に記載の塩基配列と縮重を介して異なる塩基配列で示されるポリヌクレオチド；及び

④ 上記①～③に記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうるポリヌクレオチド。

7. E d g-5又はそれと同等のポリペプチドとリガンドとを接触させた場合と、E d g-5又はそれと同等のポリペプチド、リガンドおよび試験物質とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、請求項2～6のいずれか1項に記載の方法。

8. 比較を、E d g-5又はそれと同等のポリペプチドを含有する細胞に対するリガンドの刺激活性（シグナル伝達作用）の変化、E d g-5又はそれと同等のポリペプチドに対するリガンドの結合量の変化、または細胞内でのE d g-5の発現・産生量の変化に基づいて行なうことを特徴とする、請求項2～7のいずれか1項に記載の方法。

9. E d g-5を発現しうる細胞におけるE d g-5の産生量又はmRNAの量を定量することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10. 配列番号2、4若しくは6に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその一部を用いてE d g-5のmRNAを定量することを特徴とする、請求項9に記載の方法。

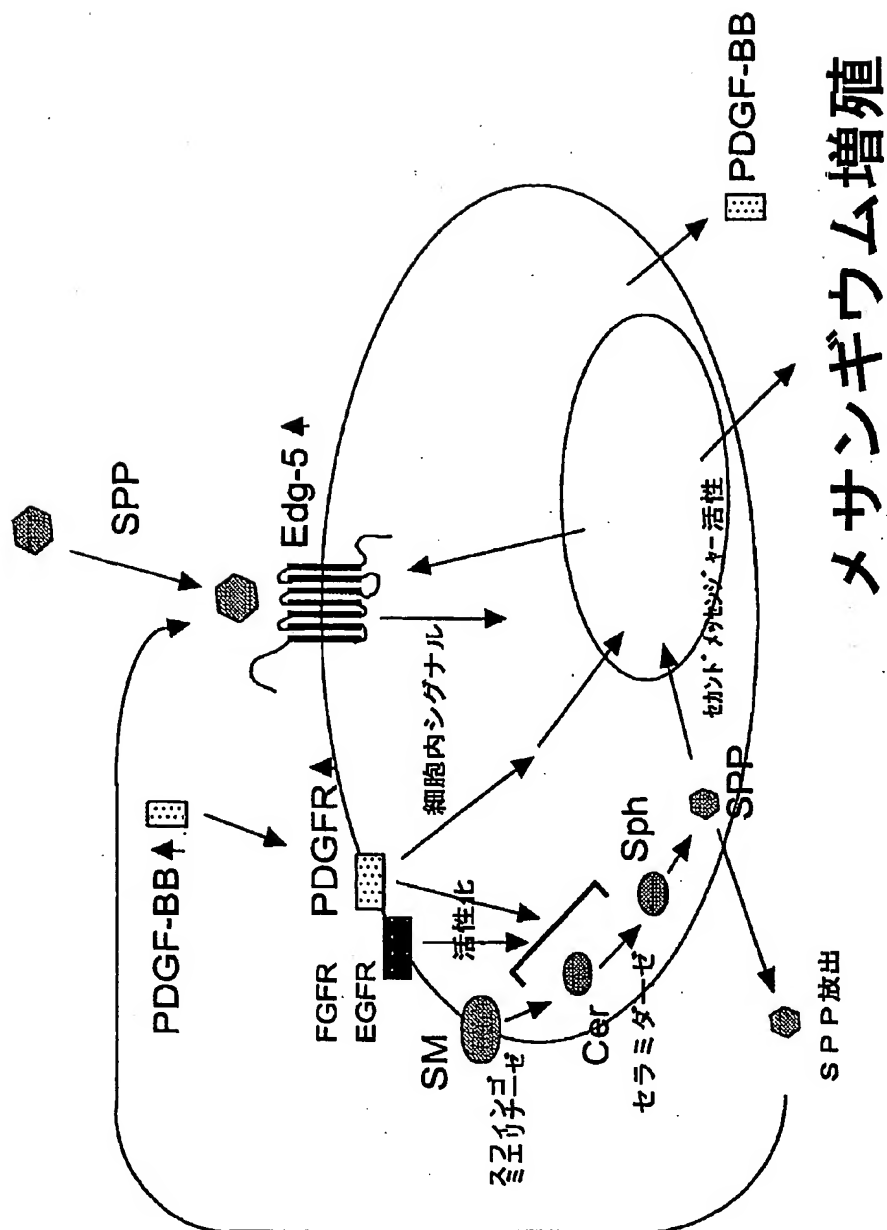
11. 請求項1～10のいずれか1項に記載の方法を実施するためのキット。

12. 請求項1～10のいずれか1項に記載の方法又は請求項11に記載のキットを用いて得られる増殖性糸球体腎炎の予防・治療薬。

13. 請求項1～10のいずれか1項に記載の方法又は請求項11に記載のキットを用いて、E d g-5のリガンドと、E d g-5又はそれと同等のポリペプチドとの結合を阻害するか、E d g-5の発現・産生を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする工程、前記物質の増殖性糸球体腎炎に対する予防又は治療効果を確認する工程、及び前記工程で増殖性糸球体腎炎に対する予防又は治療効果が確認された物質を有効成分として含有する増殖性糸球体腎炎の予防・治療薬の製造方法。

1 / 5

図 1

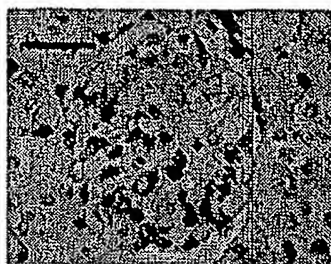


2 / 5

図 2

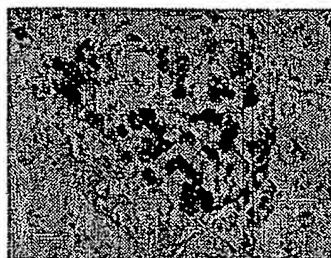
(A)

6W



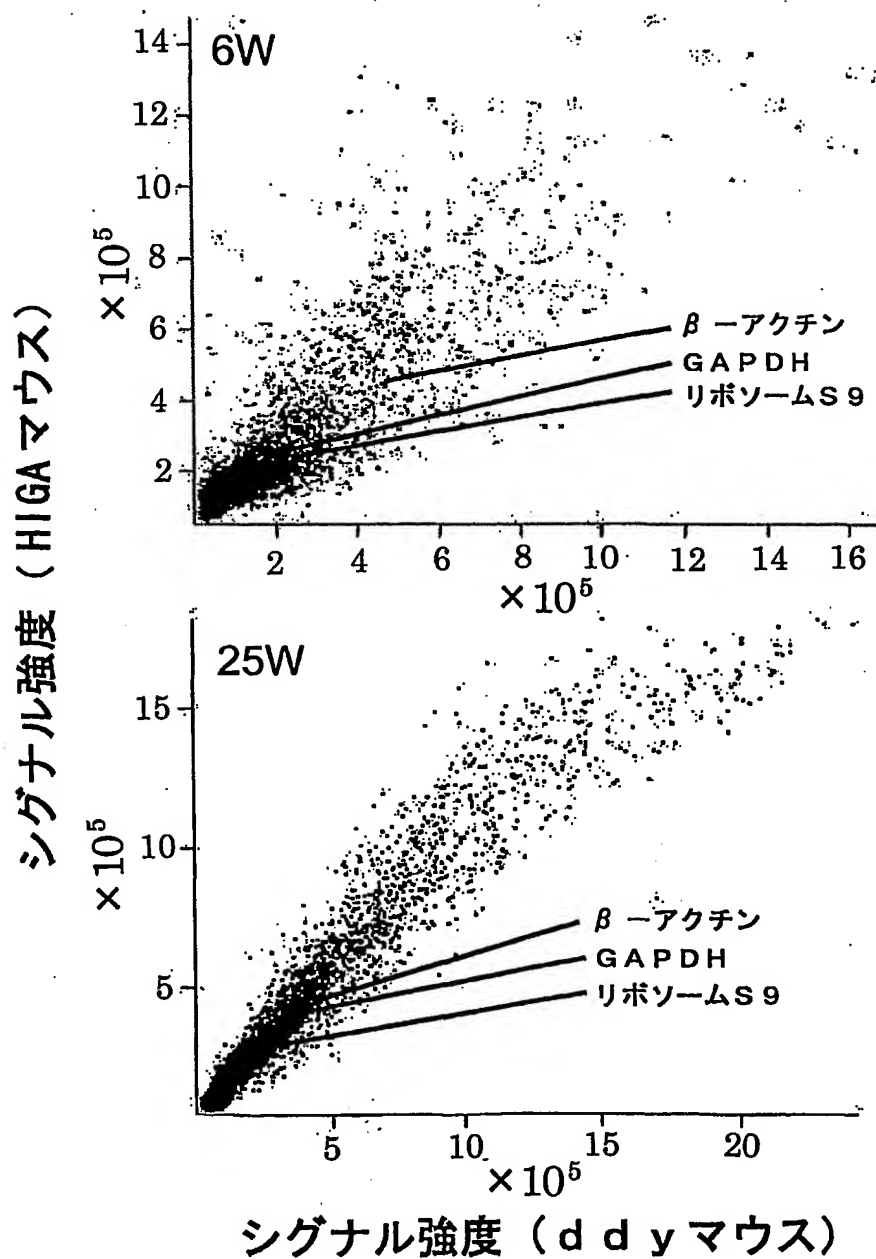
(B)

25W



3 / 5

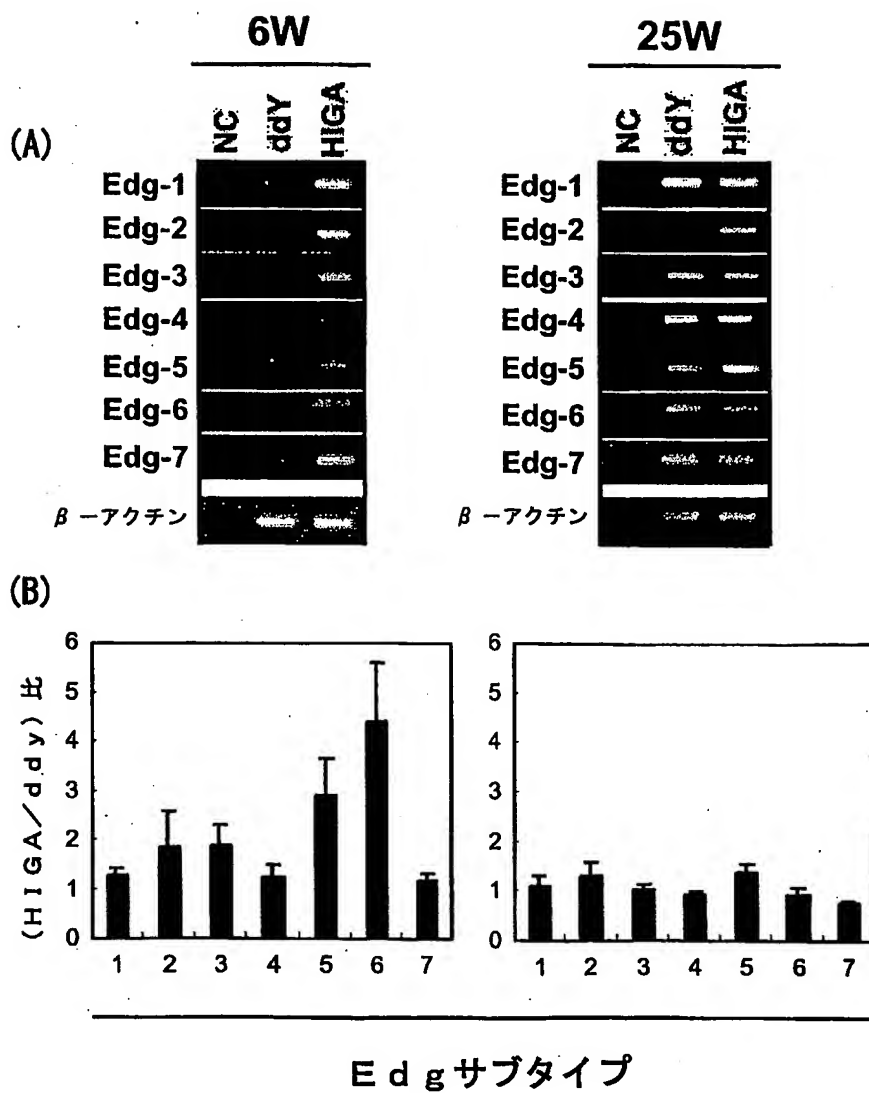
図 3





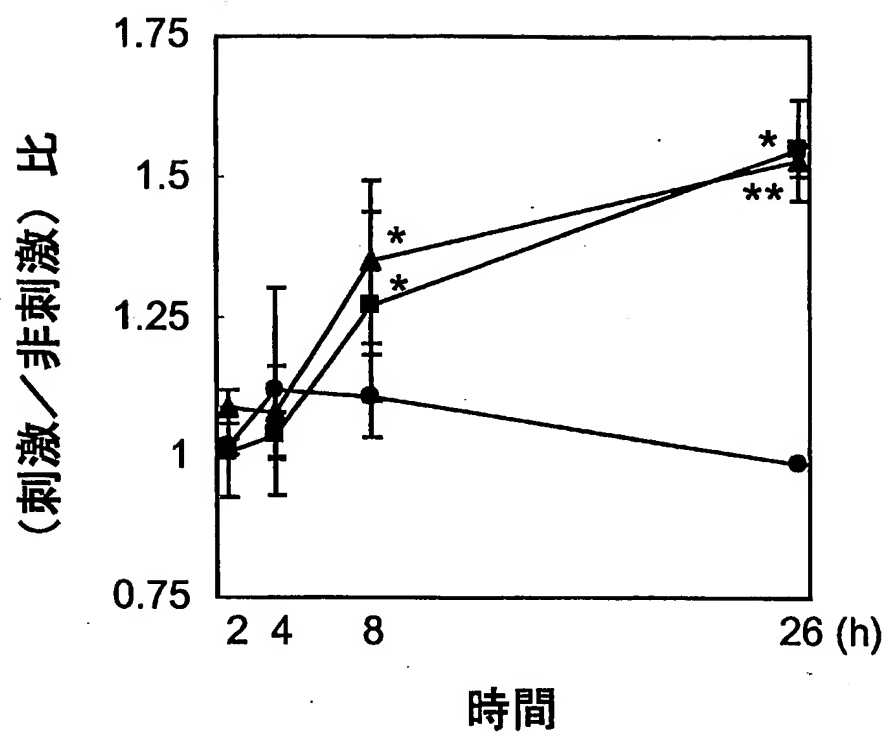
4 / 5

図 4



5 / 5

図 5



1 /15

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Nippon Shinyaku Co. Ltd.

&lt;110&gt; The Japan Human Sciences Foundation

<120> Methods of screening prophylactic or therapeutic drugs  
for proliferative glomerulonephritis

&lt;130&gt; 175336

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 38

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1062

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

atgggcagct tgtactcgga gtacctgaac cccaacaagg tccaggaaca ctataattat 60
accaaggaga cgctggaaac gcaggagacg acctcccgcc aggtggcctc ggcccttcac 120
gtcatcctct gttagcccat tgttggtgaa aaccttcttg tgctcattgc ggtggccga 180
aacagcaagt tccactcggc aatgtacctg ttctctggga acctggccgc ctccgatcta 240
ctggcaggcg tggccttcgt agccaatacc ttgctctctg gctctgtcac gctgaggctg 300
acgcctgtgc agtggtttgc cggggagggc tctgcctcca tcacgctctc ggccctctgc 360
ttcagcctcc tggccatcgc cattgagcgc cacgtggcca ttgccaaggt caagctgtat 420
ggcagcgaca agagctgcg catgcttctg ctcatcgggg cctcgtggct catctcgtg 480
gtcctcggtg gcccgcccat ccttggttgg aactgcctgg gccacctcga ggccctgtcc 540
actgtcctgc ctctctacgc caagcattat gtgtgtgcg tggtgaccat ctctccatc 600
atcctgttgg ccacgtggc cctgtacgtg cgcactact gcttggtcgc ctcaagccac 660
gctgacatgg ccgccccga gacgctagcc ctgtcaaga cggtcaccat cgtgctaggc 720
gtctttatcg tctgtggct gccgccttc agcatcctcc ttctggacta tgccgtgcc 780
gtccactcct gccgatcct ctacaaagcc cactactttt tcgccgtctc caccctgaat 840
tccctgtcga acccgtcat ctacacgtgg cgcagccggg acctgcggcg ggaggtgott 900
cggccgtgc agtgtggcg gccgggggtg ggggtgcaag gacggaggcg ggtcgggacc 960
ccgggccacc acctcctgcc actccgcagc tccagctccc tggagagggg catgcacatg 1020
cccacgtcac ccacgtttct ggagggaac acggttgtct ga 1062

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 353

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

2 /15

&lt;400&gt; 2

Met Gly Ser Leu Tyr Ser Glu Tyr Leu Asn Pro Asn Lys Val Gln Glu  
 1 5 10 15  
 His Tyr Asn Tyr Thr Lys Glu Thr Leu Glu Thr Gln Glu Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Arg Gln Val Ala Ser Ala Phe Ile Val Ile Leu Cys Cys Ala Ile Val  
 35 40 45  
 Val Glu Asn Leu Leu Val Leu Ile Ala Val Ala Arg Asn Ser Lys Phe  
 50 55 60  
 His Ser Ala Met Tyr Leu Phe Leu Gly Asn Leu Ala Ala Ser Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Gly Val Ala Phe Val Ala Asn Thr Leu Leu Ser Gly Ser Val  
 85 90 95  
 Thr Leu Arg Leu Thr Pro Val Gln Trp Phe Ala Arg Glu Gly Ser Ala  
 100 105 110  
 Ser Ile Thr Leu Ser Ala Ser Val Phe Ser Leu Leu Ala Ile Ala Ile  
 115 120 125  
 Glu Arg His Val Ala Ile Ala Lys Val Lys Leu Tyr Gly Ser Asp Lys  
 130 135 140  
 Ser Cys Arg Met Leu Leu Leu Ile Gly Ala Ser Trp Leu Ile Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Val Leu Gly Gly Leu Pro Ile Leu Gly Trp Asn Cys Leu Gly His Leu  
 165 170 175  
 Glu Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys His Tyr Val Leu  
 180 185 190  
 Cys Val Val Thr Ile Phe Ser Ile Ile Leu Leu Ala Ile Val Ala Leu  
 195 200 205  
 Tyr Val Arg Ile Tyr Cys Val Val Arg Ser Ser His Ala Asp Met Ala  
 210 215 220  
 Ala Pro Gln Thr Leu Ala Leu Leu Lys Thr Val Thr Ile Val Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Val Phe Ile Val Cys Trp Leu Pro Ala Phe Ser Ile Leu Leu Leu Asp  
 245 250 255  
 Tyr Ala Cys Pro Val His Ser Cys Pro Ile Leu Tyr Lys Ala His Tyr  
 260 265 270  
 Phe Phe Ala Val Ser Thr Leu Asn Ser Leu Leu Asn Pro Val Ile Tyr  
 275 280 285  
 Thr Trp Arg Ser Arg Asp Leu Arg Arg Glu Val Leu Arg Pro Leu Gln  
 290 295 300  
 Cys Trp Arg Pro Gly Val Gly Val Gln Gly Arg Arg Arg Val Gly Thr  
 305 310 315 320  
 Pro Gly His His Leu Leu Pro Leu Arg Ser Ser Ser Ser Leu Glu Arg  
 325 330 335  
 Gly Met His Met Pro Thr Ser Pro Thr Phe Leu Glu Gly Asn Thr Val  
 340 345 350  
 Val

3 /15

<210> 3  
 <211> 1059  
 <212> DNA  
 <213> Mouse

<400> 3  
 atgggcggct tatactcaga gtacctcaat cctgagaagg ttctggaaca ctacaattac 60  
 accaaggaga cgctggacat gcaggagacc acctcccgca aggtggcctc ggoccttcatc 120  
 atcatcttgt gctgcgccat cgtgggtggag aatcttcttg tgctcattgc agtggccagg 180  
 aacagcaagt tccactcagc aatgtacctg ttcttggca acctggcagc ctctgacctg 240  
 ctggcaggcg tggccttcgt ggccaacacc ttactctcag ggcatgtcac tctgtcctta 300  
 actcccgctgc agtgggtttgc ccgagaggto tccgccttca tcacgctctc cgccctcggtc 360  
 tttagcctcc tggccatcgc catcgagaga caagtggccc tcgccaaggt caagctctac 420  
 ggcagtgcaca aaagctgccg aatgctgatg ctcatcgggg cctcttggct gatatcgctg 480  
 attctgggtg gcttgcccat cctgggctgg aattgtctga accagctgga ggccctgctcc 540  
 accgtgctgc ctctctatgc taagcactac gtgctctgcg tggtcaccat cttctccgtc 600  
 atcttactgg ctatcgtggc totgtacgtc cgaatctact ttgtagtccg ctccagccac 660  
 gcggatgttg ctggtcctca gacgctagcc ctgctcaaga cggtcaccat cgtactgggt 720  
 gttttcatca tctgtggct gccggctttt agcatccttc tcttagactc caccgtgtccc 780  
 gtccgggcct gccctgtcct ctacaaagcc cactattttt ttgcctttgc cacccttaac 840  
 tcactgctca atcctgtcat ctatacgtgg cgtagccggg accttcggag ggagggtgctg 900  
 cggccctgc agtgtggcg gagagggaag ggagtgcagg gacgcagagg tgggaacctc 960  
 ggtaaccgac tcttgctctt ccgcagctcc agctccctgg agagaggcat gcatatgcct 1020  
 acatcaccca cattcttgga gggtaacaca gtggtctga 1059

<210> 4  
 <211> 352  
 <212> PRT  
 <213> mouse

<400> 4  
 Met Gly Gly Leu Tyr Ser Glu Tyr Leu Asn Pro Glu Lys Val Leu Glu  
 1 5 10 15  
 His Tyr Asn Tyr Thr Lys Glu Thr Leu Asp Met Gln Glu Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Arg Lys Val Ala Ser Ala Phe Ile Ile Ile Leu Cys Cys Ala Ile Val  
 35 40 45  
 Val Glu Asn Leu Leu Val Leu Ile Ala Val Ala Arg Asn Ser Lys Phe  
 50 55 60  
 His Ser Ala Met Tyr Leu Phe Leu Gly Asn Leu Ala Ala Ser Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Gly Val Ala Phe Val Ala Asn Thr Leu Leu Ser Gly His Val  
 85 90 95  
 Thr Leu Ser Leu Thr Pro Val Gln Trp Phe Ala Arg Glu Val Ser Ala

4 /15

```

      100      105      110
Phe Ile Thr Leu Ser Ala Ser Val Phe Ser Leu Leu Ala Ile Ala Ile
      115      120      125
Glu Arg Gln Val Ala Leu Ala Lys Val Lys Leu Tyr Gly Ser Asp Lys
      130      135      140
Ser Cys Arg Met Leu Met Leu Ile Gly Ala Ser Trp Leu Ile Ser Leu
145      150      155      160
Ile Leu Gly Gly Leu Pro Ile Leu Gly Trp Asn Cys Leu Asn Gln Leu
      165      170      175
Glu Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys His Tyr Val Leu
      180      185      190
Cys Val Val Thr Ile Phe Ser Val Ile Leu Leu Ala Ile Val Ala Leu
      195      200      205
Tyr Val Arg Ile Tyr Phe Val Val Arg Ser Ser His Ala Asp Val Ala
      210      215      220
Gly Pro Gln Thr Leu Ala Leu Leu Lys Thr Val Thr Ile Val Leu Gly
225      230      235      240
Val Phe Ile Ile Cys Trp Leu Pro Ala Phe Ser Ile Leu Leu Leu Asp
      245      250      255
Ser Thr Cys Pro Val Arg Ala Cys Pro Val Leu Tyr Lys Ala His Tyr
      260      265      270
Phe Phe Ala Phe Ala Thr Leu Asn Ser Leu Leu Asn Pro Val Ile Tyr
      275      280      285
Thr Trp Arg Ser Arg Asp Leu Arg Arg Glu Val Leu Arg Pro Leu Gln
      290      295      300
Cys Trp Arg Arg Gly Lys Gly Val Thr Gly Arg Arg Gly Gly Asn Pro
305      310      315      320
Gly His Arg Leu Leu Pro Leu Arg Ser Ser Ser Ser Leu Glu Arg Gly
      325      330      335
Met His Met Pro Thr Ser Pro Thr Phe Leu Glu Gly Asn Thr Val Val
      340      345      350

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2754

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 5

```

ccccctcgag cacagccaac agtcacaaaa gtcagccaact ggctgtcccg gggcgcagac 60
gccaaaggcca ctcaaggccag ggcagggacc ctggccggcc tagccagtgc tcagtcccat 120
ggccccgggc ggccactgag cccaccatg ggcggtttat actcagagta cctcaatcct 180
gagaagggtc aggaacacta caattacacc aaggagacgc tggacatgca ggagacgcc 240
tcccgcaagg tggcctccgc cttcatcato attttatgct gtgccatcgt ggtggagaac 300
cttctggtgc taatgcagt ggccaggaac agcaagttcc actcagccat gtacctgttc 360
ctcggcaacc tggcagccto cgacctgtg gcaggcgtgg cttcgtggc caacaccttg 420

```

5 /15

ctctccggac ctgtcaccct gtccttaact ccttgcagt ggtttgcccg agagggttca 480  
 gccttcatca cgctctctgc ctcggtcttc agcctcctgg ccattgccat cgagagacaa 540  
 gtggccatcg ccaaggtcaa gctctacggc agtgacaaaa gctgtogaat gttgatgtc 600  
 attggggcct cttggctgat atcgctgatt ctgggtggct tgcccatcct gggctggaat 660  
 tgtctggacc atctggaggc ttgtccact gtgtgcccc tctatgctaa gcactatgtg 720  
 ctctgcgtgg tcaccatctt ctctgtcact ttactggcta tcgtggcctt gtacgtccga 780  
 atctacttgc tagtccgctc aagccatgcg gacgttgcgt gtccctcagac gctggccctg 840  
 ctcaagacag tcaccatcgt actgggtgtt ttcatcatct gctggctgcc ggcttttagc 900  
 atccttctct tagactctac ctgtcccgtc cgggcctgtc ctgtcctcta caaagcccat 960  
 tatttctttg ccttcgccac cctcaactct ctgtcaacc ctgtcatcta tacatggcgt 1020  
 agccgggacc ttccggaggga ggtactgagg cccctgctgt gctggcggca ggggaaggga 1080  
 gcaacagggc gcagagggtg gaaccctggt caccgactcc tgccctccg cagctccagc 1140  
 tccctggaga gaggttgca tatgcctaca tcgccaacat ttctggaggg caacacagt 1200  
 gtctgagggg aaatgtgaac tgatctgtaa ccaagccaca gagagagctc tgtggggaga 1260  
 gaccagggtg cctcatcatg tccctcagt ccacaggctt ggaggaaactg accacggctc 1320  
 ataggtcagg tggccaaagg aggcactgac taatcagatt gtagtactgt gactgtgggg 1380  
 accattaagg gtctaggggg acagcaggct cgagtttagg gctagacatt tgccacttgg 1440  
 tacatagggt gtccgcatcc tgtctgtcct atcttcagc ttcccggttc ccttctgtcc 1500  
 tctctctttt aagggcctct ctacatagcc ccggtggct agagcttgcgt gtgcagacca 1560  
 ggctgacctg gacctccag agatagatca actaactgtg tctgagtgc tgggatttta 1620  
 aagccgtgtg cccccacacc cggctctgc caccctccag aagcaatctt aggccacttg 1680  
 ttgaggaaac actctcccca gaggaccaa gccttcttc ctgtctctct gaggcctgaa 1740  
 tccacagctt cccatttta tcaactgctg cttcttccct ttcttctgt gttcagggga 1800  
 aaccactgtg ggggcaggga ggggtcctgg gatcccagtt tttatgtca gatctcactg 1860  
 agcacttgc tttattggga gcagagagga atcagctgag gcagtgtggg gcagatgttg 1920  
 aggagaattt gggcttctg gtgagaaaac tctaggggag gcgttggtta ttcttggaac 1980  
 ccagcctctc tcccacgaa ctcttcacac ccgcagcctt gagctggatg caaaggctgc 2040  
 tttcaatttg tcttttagt tttgtttgt tttgtttgt tttttaaat tgggacagga 2100  
 tctcaogtac ccaggctgg cctccgactc actatgtagc caaggctggc tttggacttc 2160  
 tgaccctcct gcctccgctt ctggagtga ggtattaca ggggtgtacca ccaccaccac 2220  
 caccaccaac aacaacaaca acaacaacac ctgtcttgaa aactatcatg aatgacatgg 2280  
 ttcacatagc ctgggtggc caaggacatc ccggatactc ttatggcatc ttcttgaag 2340  
 gactttgcta aatcctgtgg agaagtagaa aatccaatac ggtacaaacg gtatttatgt 2400  
 gtgtctgtgt atcagtgtgg ggtctgtgac ctctatccc agtgtgggtg ctgtctgacc 2460  
 tcttatgtgc acatccgtgt caagactgct agagagatgg acgggggtgt gtgtgottgt 2520  
 ggggtctag ccatgatcag gcctcctggg aattgtgaa tcatctctcc cacacacaga 2580  
 cacacacctc cgcttaaaag aaatgtgtga aaaaaaggc tgaggaaggg gagatttggg 2640  
 aggcaaggag ccagtcggga gtgtgtctcc cctcatacag cttcccagat gtcccccttg 2700  
 tgctggaaac ccagaactgg gccataaaac agttcaattt ctcttgaaaa aaaa 2754

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 352

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 6

6 /15

Met Gly Gly Leu Tyr Ser Glu Tyr Leu Asn Pro Glu Lys Val Gln Glu  
 1 5 10 15  
 His Tyr Asn Tyr Thr Lys Glu Thr Leu Asp Met Gln Glu Thr Pro Ser  
 20 25 30  
 Arg Lys Val Ala Ser Ala Phe Ile Ile Ile Leu Cys Cys Ala Ile Val  
 35 40 45  
 Val Glu Asn Leu Leu Val Leu Ile Ala Val Ala Arg Asn Ser Lys Phe  
 50 55 60  
 His Ser Ala Met Tyr Leu Phe Leu Gly Asn Leu Ala Ala Ser Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Gly Val Ala Phe Val Ala Asn Thr Leu Leu Ser Gly Pro Val  
 85 90 95  
 Thr Leu Ser Leu Thr Pro Leu Gln Trp Phe Ala Arg Glu Gly Ser Ala  
 100 105 110  
 Phe Ile Thr Leu Ser Ala Ser Val Phe Ser Leu Leu Ala Ile Ala Ile  
 115 120 125  
 Glu Arg Gln Val Ala Ile Ala Lys Val Lys Leu Tyr Gly Ser Asp Lys  
 130 135 140  
 Ser Cys Arg Met Leu Met Leu Ile Gly Ala Ser Trp Leu Ile Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Ile Leu Gly Gly Leu Pro Ile Leu Gly Trp Asn Cys Leu Asp His Leu  
 165 170 175  
 Glu Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys His Tyr Val Leu  
 180 185 190  
 Cys Val Val Thr Ile Phe Ser Val Ile Leu Leu Ala Ile Val Ala Leu  
 195 200 205  
 Tyr Val Arg Ile Tyr Phe Val Val Arg Ser Ser His Ala Asp Val Ala  
 210 215 220  
 Gly Pro Gln Thr Leu Ala Leu Leu Lys Thr Val Thr Ile Val Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Val Phe Ile Ile Cys Trp Leu Pro Ala Phe Ser Ile Leu Leu Leu Asp  
 245 250 255  
 Ser Thr Cys Pro Val Arg Ala Cys Pro Val Leu Tyr Lys Ala His Tyr  
 260 265 270  
 Phe Phe Ala Phe Ala Thr Leu Asn Ser Leu Leu Asn Pro Val Ile Tyr  
 275 280 285  
 Thr Trp Arg Ser Arg Asp Leu Arg Arg Glu Val Leu Arg Pro Leu Leu  
 290 295 300  
 Cys Trp Arg Gln Gly Lys Gly Ala Thr Gly Arg Arg Gly Gly Asn Pro  
 305 310 315 320  
 Gly His Arg Leu Leu Pro Leu Arg Ser Ser Ser Ser Leu Glu Arg Gly  
 325 330 335  
 Leu His Met Pro Thr Ser Pro Thr Phe Leu Glu Gly Asn Thr Val Val  
 340 345 350



7 /15

<210> 7  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer  
for PCR

<400> 7  
atcagctgc tgtctagc 18

<210> 8  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Reverse primer  
for PCR

<400> 8  
taggaagaag aattgacg 18

<210> 9  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 9  
ctgctggcta ttgctatc 18

<210> 10  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 10

8 /15

aacacaggat ctgoc tga

18

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 11

ctgacatga tcaagatg

18

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 12

gttctgaaac gacctgtt

18

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 13

ttgctacctg cacacttc

18

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

9 /15

<400> 14  
cacatgcagc agagaagg

18

<210> 15  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 15  
tggaattgtc tgaaccag

18

<210> 16  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 16  
tcagaccact gtgttacc

18

<210> 17  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 17  
atcggtotgt gctggcta

18

<210> 18  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

10/15

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 18  
ctagtgctg cggacgct 18

<210> 19  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 19  
atgagtgta ctatgaca 18

<210> 20  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 20  
gttcagagg caattcca 18

<210> 21  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 21  
tatgtgctct totgcgtg 18

<210> 22  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

11/15

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 22

tcagtctgta gcatcagg

18

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 23

tgttcattct catctgctgc

20

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 24

tatagtgtt gtggtagagc

20

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 25

gccacagaat ggaacacagt

20

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 20

12/15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 26

ccagaactat gccgagacat

20

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 27

tcattggcaa cttggctctc

20

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 28

ccagcatgat gaaccactga

20

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 29

tgctgaccaa tctgtgtgt

19

13/15

<210> 30  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 30  
agtaggaaga caagcaggct

20

<210> 31  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 31  
gccatcgcca aggtcaagct

20

<210> 32  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 32  
actgtgttgc cctccagaaa

20

<210> 33  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

<400> 33

14/15

ggcatggact ggatcctg

18

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 34

cagactcact ggatctggat

20

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR

&lt;400&gt; 35

tgagtgtcac tatgacaagc

20

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

&lt;400&gt; 36

atgttgaga ggcaattcca

20

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Forward primer  
for PCR



15/15

<400> 37

tgctcttctg cgtgctgg

18

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer  
for PCR

<400> 38

aaactgttgg aggagtcttg

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02828

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/50, G01N33/15, G01N33/566, A61P13/12, A61K45/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/50, G01N33/15, G01N33/566, A61P13/12, A61K45/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ON LINE "EDG" JOIS "EDG"		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/56135 A (The Regents of The University of California), 28 September, 2000 (28.09.00), (Family: none)	1-13
A	WO 99/35259 A (Allelix Biopharmaceuticals Inc.), 15 July, 1999 (15.07.99), (Family: none)	1-13
A	Molecular and Cellular Biology, December 2000, Vol.20, No.24, pages 9247 to 9261	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 April, 2002 (10.04.02)		Date of mailing of the international search report 23 April, 2002 (23.04.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl.	G01N33/50 A61P13/12	G01N33/15 A61K45/00
G01N33/566		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl.	G01N33/50 A61P13/12	G01N33/15 A61K45/00
G01N33/566		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1922-1996年		
日本国公開実用新案公報 1971-2002年		
日本国登録実用新案公報 1994-2002年		
日本国実用新案登録公報 1996-2002年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAS ON LINE "EDG"		
JOIS "EDG"		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/56135 A(The Regents of The University of California) 2000.09.28, (ファミリーなし)	1-13
A	WO 99/35259 A(Allelix Biopharmaceuticals Inc.)1999.07.15 (ファミリーなし)	1-13
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, December 2000, vol. 20, no. 24, p. 9247-9261	1-13
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー		
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 10.04.02		国際調査報告の発送日 23.04.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 宮澤 浩 電話番号 03-3581-1101 内線 3250

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**